

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**  
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**THIAGO PAVONI GOMES CHAGAS**

**DETECÇÃO DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES**  
**AOS ANTIMICROBIANOS EM ESGOTO**  
**HOSPITALAR NO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2011

# **Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro**

THIAGO PAVONI GOMES CHAGAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marise Dutra Asensi

Rio de Janeiro  
2011

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ – RJ

C433

Chagas, Thiago Pavoni Gomes.

Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em  
esgoto hospitalar no Rio de Janeiro. / Thiago Pavoni Gomes Chagas. –  
Rio de Janeiro, 2011.

xvi, 129 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação  
em Medicina Tropical, 2011.

Bibliografia: f. 83-107

1. Bactérias. 2. Efluente hospitalar. 3. Resistência. 4.ESBL. 5. KPC.  
6. Rio de Janeiro I. Título.

CDD 579.308153

THIAGO PAVONI GOMES CHAGAS

**Detecção de bactérias multirresistentes aos  
antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marise Dutra Asensi

Aprovada em: 24 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Viviane Zahner (Presidente)  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Dalton Marcondes Silva  
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca - FIOCRUZ

Prof. Dr. Sergio Eduardo Longo Fracalanza  
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

Suplentes:

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Prof. Dr. Filipe Anibal Carvalho Costa (Revisor)  
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Ao meu irmão Lucas pela amizade,  
por todo apoio.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, verdadeiro responsável por eu chegar até aqui. Agradeço a Deus, pela vida.

Aos meus pais, Sergio e Celma. Em especial, agradeço à minha mãe pelo apoio, paciência, proteção e carinho em todos os momentos de minha vida.

Ao meu irmão Lucas, a quem dedico este trabalho, pelo grande companheirismo.

À minha Tia Rosaura, pelo grande apoio.

À toda minha família, por acreditar em mim.

À Professora Dra. Marise Dutra Asensi, pela orientação e oportunidades oferecidas, as quais me fizeram chegar até aqui.

A todos os meus amigos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (IOC/FIOCRUZ) pela colaboração na realização deste trabalho e disposição em ajudar no que fosse necessário.

Ao Dr. Dalton Marcondes da Silva pela colaboração no desenvolvimento da pesquisa.

A todos os meus amigos e colegas da Medicina Tropical. Em especial, agradeço aos companheiros da turma 2009/1.

A todos os professores da Pós-graduação, que contribuíram para minha formação acadêmica e profissional.

Aos secretários e demais funcionários da Secretaria Acadêmica, pela atenção.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigado.

“Nada é tão perigoso quanto a certeza de ter a  
razão.”

(François Jacob)

"Tudo tem seu tempo e até certas manifestações  
mais vigorosas e originais entram em voga ou  
saem de moda. Mas a sabedoria tem uma  
vantagem: é eterna."

(Baltasar Gracián)

## RESUMO

Drogas antimicrobianas e bactérias resistentes aos antimicrobianos estão disseminadas em grandes quantidades no ambiente, como resultado do aumento e freqüente uso indiscriminado dos antibióticos. Bactérias e seus genes de resistência têm sido detectados em diferentes ambientes, tais como esgoto hospitalar, esgoto doméstico e águas de rios contaminados. O esgoto hospitalar é um importante poluente, representando riscos para a saúde pública se chegar aos sistemas de distribuição. Ambientes fortemente seletivos, como os hospitais, permitem a geração de bactérias resistentes, as quais podem ser lançadas no esgoto hospitalar. O presente trabalho tem como objetivo investigar a presença de bactérias resistentes aos antimicrobianos em efluentes de uma estação de tratamento de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro, avaliando o potencial do sistema de tratamento para a eliminação de micro-organismos. A estação de tratamento de esgoto fica localizada na região metropolitana. O sistema de lodo ativado por aeração prolongada é constituído por três partes básicas: o tanque de aeração, o decantador e o tanque de cloração. Vinte e quatro amostras de esgoto foram coletadas no período de Julho a Dezembro de 2008. Oito amostras (1000 mL) foram coletadas a partir de diferentes pontos: afluente, efluente do tanque decantador e efluente clorado. Micro-organismos indicadores também foram investigados. Os isolados bacterianos foram identificados a partir de provas bioquímicas convencionais. A sensibilidade aos antimicrobianos das bactérias isoladas foi determinada através do método fenotípico de difusão em ágar, de acordo com as orientações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A identificação da produção fenotípica de beta-lactamases de espectro estendido e de carbapenemases entre os isolados também seguiu as recomendações do CLSI. Ensaios de PCR foram processados para a identificação dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>*. A genotipagem das amostras bacterianas foi realizada por eletroforese em gel de campo pulsado. Concentrações significativas de coliformes totais e fecais foram detectadas nos efluentes hospitalares. Um total de 226 isolados foi identificado, entre os quais 213 (94%) pertenciam à família *Enterobacteriaceae*. Outros grupos de micro-organismos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Aeromonas* spp., foram também observados. A maioria das cepas era sensível ao imipenem e ao meropenem; e resistente à cefalotina, à cefotaxima e ao sulfametoxazol-trimetoprim. O fenótipo de ESBL foi caracterizado em 97 (43%) isolados. Os produtores de ESBL mais comuns foram: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Escherichia coli*. Micro-organismos patogênicos e altas taxas de resistência ainda puderam ser observados nos efluentes clorados. Os genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>* e *bla<sub>CTX-M</sub>* foram detectados em 82%, 48% e 67% dos isolados do efluente hospitalar, respectivamente. Em muitos isolados, a ocorrência de mais de um tipo de ESBL foi observada, sendo a associação dos tipos TEM e CTX-M a mais frequente. O gene *bla<sub>KPC</sub>* foi detectado em dois isolados do efluente. Foi possível observar isolados clínicos e do esgoto geneticamente relacionados. Concluímos que, apesar do tratamento, o esgoto hospitalar pode ser considerado um veículo ambiental de disseminação de bactérias multirresistentes. A ocorrência destes micro-organismos nos efluentes é preocupante e tem impacto sobre a saúde pública. Medidas urgentes são necessárias para enfrentar este problema. Vale ressaltar que, em muitos países em desenvolvimento, os efluentes hospitalares não recebem tratamento adequado.

Palavras-chave: bactérias, efluente hospitalar, resistência, ESBL, KPC, Rio de Janeiro.

## ABSTRACT

Antimicrobial drugs and antimicrobial-resistant bacteria are discharged in large quantities in the environment as a result of increasingly frequent and indiscriminate use of antibiotics. Antimicrobial-resistant bacteria and antimicrobial-resistant genes have been detected in different environments, such as domestic sewage, hospital sewage and sewage-contaminated river waters. Hospital sewage is an important pollutant, representing risks to public health if it reaches the distribution system. The occurrence of strongly selective environments, such as hospitals, leads to an increase of multiresistant bacteria, which can be released in hospital sewage. The aim of this study was to investigate the antimicrobial-resistant bacteria isolated from a hospital sewage treatment plant in Rio de Janeiro city, evaluating the treatment plant's potential to remove these microorganisms. The sewage treatment plant serve a hospital located in the metropolitan area of the Rio de Janeiro city (RJ), Brazil. The extended aeration activated sludge plant is divided into three parts, an aeration tank, a clarifier tank and a chlorine contact tank. During the study, twenty-four sewage samples were collected in the period from July to December 2008. Eight samples (1000 ml) were collected on each day from the following: influent; clarifier tank effluent; and chlorine contact tank effluent. Total and faecal coliforms concentrations were also determined. Isolates were identified using established biochemical procedures. The antimicrobial susceptibilities of bacterial isolates were determined using the agar diffusion method according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Isolates were screened for the KPC- and ESBL-producing phenotype according to the CLSI. PCR experiments were used for the molecular detection of *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. The genetic relationships of isolates were determined by PFGE. High concentrations of total and faecal coliforms were detected in the influent, clarifier tank and chlorine contact tank effluent. A total of 226 isolates were identified, among which 213 (94%) were *Enterobacteriaceae*. In addition, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Aeromonas* spp. in hospital effluent were observed. The majority of the strains were susceptible to imipenem and meropenem and resistant to cefalothin, cefotaxime and trimethoprim-sulphametoxazole. ESBL phenotype was characterized in 97 (43%) isolates. The most common ESBL-producing isolates were: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Escherichia coli*. Pathogenic microorganisms and higher antimicrobial resistance rates were detected in chlorine contact tank effluent. The *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were detected in 82%, 48% and 67% of isolates respectively. Many of the isolates harboured other  $\beta$ -lactam resistance enzymes and the association of types TEM and CTX-M was more frequent. The *bla*<sub>KPC</sub> was detected in isolates from effluents. PFGE analysis revealed clonal types among clinical isolates and isolates from effluents. Despite the treatment of the wastewater, hospital effluent may be considered as a potential environmental vehicle of multiresistant microorganisms. The occurrence of multiresistant bacteria isolates in hospital effluents is worrisome and has a real impact on public health. Urgent measures are necessary in order to counteract this problem. It should be noted that effluents from hospitals in developing countries do not receive adequate treatment.

Keywords: bacteria, hospital wastewater, resistance, ESBL, KPC, Rio de Janeiro.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Esquema geral dos sistemas de lodo ativado .....	12
Figura 4.1 Cartelas Colilert® (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA) .....	39
Figura 4.2 Seladora Colilert® (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA) .....	40
Figura 4.3 Esquema das diluições empregadas no trabalho .....	41
Figura 4.4 Bactérias isoladas após período de incubação .....	41
Figura 4.5. Etapa de identificação dos isolados bacterianos .....	42
Figura 4.6 Antibiograma; método de difusão em ágar .....	44
Figura 4.7 Detecção fenotípica positiva de ESBL.....	45
Figura 4.8 Esquema de realização do teste de Hodge modificado .....	46
Figura 5.1 Número mais provável (NMP) de coliformes totais por 100 mL de amostra nas respectivas coletas .....	50
Figura 5.2 Número mais provável (NMP) de coliformes fecais por 100 mL de amostra nas respectivas coletas .....	51
Figura 5.3 Perfil (frequência) de resistência aos antimicrobianos entre <i>K. pneumoniae</i> isoladas em todos os pontos de coleta da ETE.....	56
Figura 5.4 Perfil (frequência) de resistência aos antimicrobianos entre enterobactérias de origem clínica coletadas para análise do PFGE.....	58
Figura 5.5 Espécies identificadas como produtoras de ESBL.....	59

Figura 5.6 Perfil (frequência) de resistência aos antimicrobianos entre os micro-organismos produtores de ESBL isolados dos efluentes hospitalares .....	60
Figura 5.7 Gel representativo dos produtos da amplificação por PCR de amostras de <i>K. pneumoniae</i> isoladas dos efluentes hospitalares.....	63
Figura 5.8 Gel representativo com os perfis de eletroforese em gel de campo pulsado. ....	64
Figura 5.9 Dendrograma gerado a partir dos pulsotipos de <i>K. pneumoniae</i> obtidos pela técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) .....	65

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 Principais grupos de antibióticos .....	15
Tabela 2.2 Classificação das beta-lactamases .....	30
Tabela 4.1 Antibióticos utilizados, concentração e classe a que pertencem .....	43
Tabela 4.2 Iniciadores utilizados nas reações de PCR .....	47
Tabela 5.1 Médias das contagens de coliformes totais e fecais em diferentes estágios da estação de tratamento.....	51
Tabela 5.2 Médias das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) nos diferentes meios de cultura por ponto de coleta. ....	52
Tabela 5.3 Distribuição do número de colônias identificadas por pontos de coleta .....	52
Tabela 5.4 Bactérias identificadas nas amostras do sistema de tratamento de esgoto .....	54
Tabela 5.5 Percentual de resistência entre enterobactérias para cada antimicrobiano de acordo com o ponto de coleta.....	55
Tabela 5.6 Perfil de <i>Aeromonas</i> spp. (n=5) resistentes aos antibióticos testados .....	56
Tabela 5.7 Frequência e distribuição dos isolados produtores e não-produtores de ESBL nos pontos de coleta .....	58
Tabela 5.8 Frequência dos determinantes genéticos <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> e <i>bla</i> <sub>SHV</sub> entre os produtores de ESBL por ponto de coleta.....	61

Tabela 5.9 Frequência dos determinantes genéticos <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM</sub> e <i>bla</i> <sub>SHV</sub> entre as espécies produtoras de ESBL .....	61
Tabela 5.10 Frequência dos perfis de detecção dos determinantes genéticos .....	62
Tabela 5.11 <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC isoladas nos efluentes hospitalares .....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMK	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APHA	American Public Health Association
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
<i>bla</i>	Gene $\beta$ -lactamases
BRIJ	<i>Nonionic polyoxyethylene surfactant</i>
CAZ	Ceftazidima
CEF	Cefalotina
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CN	Gentamicina
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CT	Colistina
CTX	Cefotaxima
CV	meio Costa & Vernim
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E M B	<i>Eosin Methylene Blue</i>
ESBL	Beta-lactamase(s) de espectro estendido
<i>et al</i>	e outros
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
EUA	Estados Unidos da América
FEP	Cefepime
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
GSP	<i>Glutamate Starch Phenol</i>
HCl	Ácido clorídrico

IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MEM	Meropenem
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
MUG	4-metilumbeliferil-β-D-glucuronide
NaCl	Cloreto de sódio
NMP	Número Mais Provável
OMS	Organização Mundial de Saúde
ONPG	Nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PB	Polimixina B
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PGRSS	Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
RNA	Ácido ribonucléico
RSS	Resíduos de Serviços de Saúde
SAM	Ampicilina-sulbactam
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIM	Sulfato/Indol/Motilidade
SXT	Sulfametoxazol-trimetoprim
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tris-EDTA-água
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
TSB	<i>Trypticase Soy Broth</i>
TTC	Cloreto de Trifeniltetrazólico
TZP	Piperacilina-tazobactam
UASB	Reator Anaeróbico de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

UV	Luz Ultravioleta
%	porcentagem
°C	graus centígrados
µg	micrograma
µL	microlitro
β	beta
cm	centímetro
Kb	kilobase
L	litro
M	molar
Mb	megabase
mM	milimolar
mg	miligrama
mL	mililitro
n°	número
pb	pares de base
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomol
rpm	rotações por minuto
U	unidade
V	volt
X	vezes
®	marca registrada

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>3</b>
2.1 SANEAMENTO, SAÚDE E AMBIENTE .....	3
2.2 EFLUENTES HOSPITALARES .....	5
2.2.1 Legislação .....	7
2.3 NÍVEIS, PROCESSOS E SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTOS.....	9
2.3.1 Sistema de lodo ativado .....	10
2.4 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES – Coliformes totais e fecais .....	12
2.5 ANTIBIÓTICOS .....	13
2.5.1 Antibióticos beta-lactâmicos .....	17
2.5.2 Antibióticos no ambiente.....	18
2.6 INFECÇÕES HOSPITALARES E PRINCIPAIS BACTÉRIAS ASSOCIADAS .....	21
2.6.1 <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	22
2.6.2 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	23
2.6.3 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	24
2.7 RESISTÊNCIA BACTERIANA .....	25
2.8 ENZIMAS BETA-LACTAMASES .....	28
2.8.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL) .....	32
2.8.2 Carbapenemases do tipo KPC .....	35
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DO ESGOTO .....	38
4.2 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS .....	39
4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO ESGOTO .....	40
4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DOS ISOLADOS CLÍNICOS .....	42
4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	42
4.6 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBL .....	44
4.7 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES .....	45

4.8 EXTRAÇÃO DE DNA .....	46
4.9 DETECÇÃO DOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA .....	46
4.9.1 Detecção de <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> .....	47
4.9.2 Detecção de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	47
4.9.3 Eletroforese em Gel de Agarose .....	48
4.10 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO DNA GENÔMICO .....	48
4.11 ANÁLISE DOS DADOS .....	49
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>50</b>
5.1 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS .....	50
5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	51
5.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	55
5.4 DETECÇÃO DE ESBL E CARBAPENEMASES TIPO KPC .....	58
5.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO DNA GENÔMICO .....	63
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>108</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Os resíduos dos estabelecimentos de saúde ocupam uma posição significativa pela sua capacidade de contaminar os seres humanos e o meio ambiente. No Brasil, não há uma preocupação efetiva com relação ao gerenciamento e ao descarte dos resíduos gerados nas instituições de saúde, bem como para as águas residuárias provenientes destes locais. O aumento na quantidade destes resíduos e seus respectivos despejos têm impacto sobre os recursos hídricos destinados ao consumo humano, especialmente, quando os sistemas de abastecimento de água e esgoto são precários. A implantação dos serviços de saneamento deve ter um tratamento prioritário e o bom funcionamento desses serviços se reflete na melhoria das condições de saúde.

Tem sido verificado que os problemas de saúde das populações estão diretamente relacionados com precariedades em saneamento básico e a conseqüente degradação ambiental (GIATTI *et al.*, 2004). A infra-estrutura sanitária deficiente apresenta uma nítida interface com a situação de saúde e com as condições de vida das populações dos países em desenvolvimento, nos quais as doenças infecciosas continuam sendo uma importante causa de morbidade e mortalidade. A alta prevalência dessas doenças constitui um forte indicativo da fragilidade dos sistemas públicos de saneamento.

Os grandes centros urbanos possuem maior número de estabelecimentos de saúde e, conseqüentemente, geram aumento da quantidade de efluentes poluídos e contaminados (VECCHIA *et al.*, 2009). Sendo assim, quando não tratados, os efluentes hospitalares contêm importantes contaminantes. Embora bactérias resistentes tenham sido isoladas frequentemente em amostras clínicas, muitos micro-organismos resistentes e seus genes de resistência têm sido detectados em esgoto hospitalar e em outras amostras ambientais, tais como esgoto doméstico, lodo de esgoto, lagoas, água de mar, águas subterrâneas e águas de rio contaminado com esgoto (HEUER *et al.*, 2002; MEIRELLES-PEREIRA *et al.*, 2002; REINTHALER *et al.*, 2003; SCHWARTZ *et al.*, 2003; TENNSTEDT *et al.*, 2003; COSTANZO *et al.*, 2005; GALLERT *et al.*, 2005).

Ambientes fortemente seletivos, como os hospitais, levam a um aumento da frequência de bactérias resistentes a antimicrobianos, as quais são liberadas no esgoto hospitalar e, a partir deste, alcançam o sistema de esgoto municipal, que por sua vez, é lançado, frequentemente, em corpos d'água como os rios, os lagos e os oceanos, sem

tratamento prévio. A propagação de micro-organismos resistentes contribui para o aumento das taxas de infecção hospitalar e comunitária, o que eleva as taxas de morbidade e mortalidade (CALIJURI *et al.*, 2009).

Um fator também bastante relevante para o aumento da resistência bacteriana é o uso indiscriminado de antimicrobianos. A preocupação com o impacto dos resíduos de antibióticos no ambiente vem crescendo nos últimos anos (WRIGHT, 2007; KEMPER, 2008). Os antimicrobianos possuem uma elevada demanda tanto na medicina quanto para as práticas agropecuárias. Como resultado do aumento e frequente uso dos antibióticos nas práticas médicas, veterinárias e agrárias, estes são descartados em grandes quantidades no ambiente. Além da poluição química provocada pelos antibióticos por si só, o uso indiscriminado pode também acelerar o surgimento de cepas resistentes aos antibióticos convencionais, inclusive com resistências múltiplas (KEMPER, 2008).

A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos é um problema crescente e a produção de  $\beta$ -lactamases, principalmente as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), é o mecanismo mais comum de resistência às drogas (HÉRITIER *et al.*, 2005). Relatos de infecções com cepas bacterianas produtoras de ESBL, principalmente bactérias da família *Enterobacteriaceae*, são mais frequentes em pacientes hospitalizados. Essas enzimas são, geralmente, codificadas por plasmídeos e, portanto, mais facilmente disseminadas. As ESBLs também têm sido descritas em pacientes na comunidade. Pouco se sabe sobre os mecanismos de disseminação de ESBL em diferentes ambientes (MESA *et al.*, 2006). Nos últimos anos, alguns tipos de ESBLs, conhecidas por serem relevantes na medicina humana, têm sido descritas em isolados de animais (CARATTOLI, 2008). Outra preocupação emergente corresponde às carbapenemases do tipo KPC, relatadas, até o momento, apenas em pacientes hospitalizados (PEIRANO *et al.*, 2009). Em função da eficiente atividade destas enzimas, o perfil de resistência apresentado pelas bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases é muito amplo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SANEAMENTO, SAÚDE E AMBIENTE

A qualidade de vida de uma população depende de muitos fatores e, entre eles, destacam-se o acesso a bens e serviços econômicos e sociais como educação básica, alimentação adequada, serviços de saúde eficientes e saneamento básico. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1946), a saúde compreende muito mais do que a ausência de doença, ou seja, envolve também um estado adequado de bem-estar físico, mental e social. Assim, as noções de assistência de saúde e de cura são incorporadas como um aspecto da promoção de saúde. Conforme Marcondes (2004), saúde não pode se constituir na ausência de doenças. A saúde, portanto, não seria responsabilidade exclusiva dos serviços de assistência, ou seja, da biomedicina. Como sinônimo de qualidade de vida, ela constituiria uma preocupação e uma busca que permeia todo o tecido social com igual intensidade.

As ações de promoção da saúde das pessoas são capazes de controlar os fatores determinantes de seu adoecimento. Segundo Bydlowski *et al.* (2004), a promoção da saúde constitui um movimento cuja principal preocupação é o desenvolvimento do ser humano em um mundo saudável. Dessa forma, a construção de indicadores que possibilitem a visão e a integralidade da relação saúde e ambiente contribuem para o desenvolvimento de ações de promoção e prevenção.

Nesse contexto, saneamento corresponde ao conjunto de medidas realizadas para modificar as condições do meio, prevenir doenças e promover a saúde. De acordo com Moraes (1993), saneamento é o conjunto de ações e medidas para a melhoria da salubridade ambiental, prevenção de doenças e promoção da saúde. Entre estas ações, destacam-se: abastecimento de água para assegurar a higiene e o conforto; coleta, tratamento e disposição adequada dos esgotos e dos resíduos sólidos; drenagem urbana de águas pluviais; e controle ambiental de vetores e reservatórios de doenças.

Diversos discursos podem ser encontrados na literatura científica, indicativos de como o saneamento vem sendo percebido em sua relação com a saúde e o ambiente. Entre eles destaca-se um grupo de discursos alicerçados na prevenção de doenças, segundo os quais cabe ao saneamento higienizar o ambiente e com isso evitar as doenças. Há também outro grupo, cuja visão se aproxima dos pressupostos da promoção da saúde, de acordo com os quais o

saneamento assume ações para a melhoria da qualidade ambiental e de vida e para a erradicação das doenças (SOUZA, 2007). A relação entre saneamento, ambiente e saúde é evidente. O saneamento interfere diretamente sobre a saúde, o ambiente e a qualidade de vida da população. Um dos campos de influência das ações em saneamento são o abastecimento de água, a coleta e o tratamento das águas residuárias. Ações de abastecimento de água e de esgotamento sanitário proporcionam benefícios gerais sobre a saúde da população (HELLER, 1998).

A falta de tratamento adequado de esgotos, principalmente em regiões de grande adensamento populacional, pode comprometer a qualidade da água dos corpos receptores, podendo provocar alterações no ambiente aquático, prejudicando o ecossistema em equilíbrio. A contaminação dos corpos hídricos naturais representa um risco à saúde pública, sendo amplamente conhecida a estreita relação entre qualidade de água e as doenças que afetam as populações, principalmente as não atendidas por serviços de saneamento (LIBANIO *et al.*, 2005). Estudos realizados sobre saneamento e saúde atestam a melhoria dos indicadores de saúde a partir de intervenções em abastecimento de água e esgotamento sanitário (HELLER, 1997). Problemas de saúde pública ocorridos pela falta ou insuficiência dos serviços de saneamento básico oferecidos, mais especificamente pela carência de coleta ou tratamento adequado de esgotos, ainda persistem na atualidade, principalmente nos países em desenvolvimento (LUDWIG, 1999). Na maioria destes países, a impropriedade e a carência de infra-estrutura sanitária é responsável pela alta mortalidade por doenças de veiculação hídrica e por um grande número de mortes evitáveis a cada ano. Nesses países, verificam-se condições que tendem a piorar devido às necessidades crescentes de serviços e ações de saneamento ambiental, que excedem a capacidade dos governos de reagir adequadamente (TEIXEIRA *et al.*, 2005).

Mesmo com o irrefutável conhecimento da importância do saneamento para a saúde pública, existem regiões ao redor do mundo onde se verificam irregularidades quanto ao abastecimento público de água, aos esgotos sanitários e aos resíduos sólidos. O déficit de saneamento no Brasil vem se constituindo em uma preocupação crescente. Cerca de 2,4 bilhões de pessoas (quase a metade da população do planeta) não vivem em condições aceitáveis de saneamento, enquanto 1,1 bilhões de pessoas não têm acesso a abastecimento de água adequado (GIATTI, 2007). No Brasil, 36,1% dos domicílios não são abastecidos de água por rede geral, 7,2% do volume de água distribuída não recebe tratamento e 47,8% dos municípios não contam com serviço de esgotamento sanitário (IBGE, 2000).

Um problema crítico em todos os países da América Latina corresponde à descarga de águas residuárias sem tratamento. Das águas residuárias coletadas, menos de 10% recebe algum tipo de tratamento e, se o recebe, este é frequentemente inadequado (OPAS, 1999). No Brasil, a oferta e a qualidade na distribuição dos serviços de esgotamento são insuficientes. Entre os serviços de saneamento básico, o esgotamento sanitário é o que tem menor presença nos municípios brasileiros. Um dado alarmante é que, nas localidades que não tratam seus esgotos, estes são despejados *in natura* nos corpos receptores, principalmente nos rios, comprometendo a qualidade da água utilizada para o abastecimento, irrigação e recreação (IBGE, 2000).

Entre os setores da infra-estrutura brasileira, o abastecimento de água e o esgotamento sanitário são os que mais têm apresentado dificuldades econômicas e institucionais, com repercussão sobre os índices de atendimento e sobre a qualidade dos serviços. Entre os principais problemas do setor, encontram-se: a baixa eficiência operacional, a insuficiência de investimentos, a ausência de regulação e de controle social, e a presença de déficit de atendimento, especialmente no que se refere à coleta e tratamento de esgotos sanitários. As dificuldades institucionais são agravadas pela inexistência de uma política nacional para o setor de água e esgotos que aponte para a retomada dos investimentos, a regulação, o controle social e a universalização dos serviços (GALVÃO JUNIOR *et al.*, 2009).

Diante da insuficiência e das desigualdades na oferta e na qualidade dos serviços de esgotamento sanitário prestados, assim como dos perfis socioeconômico e epidemiológico das comunidades brasileiras, torna-se necessário implementar sistemas de tratamento de esgotos que sejam viáveis às condições locais, que apresentem baixos custos de implantação, operação e manutenção, que possuam simplicidade operacional, índices mínimos de mecanização e redução de gasto energético, sem que se perca de vista a qualidade e a eficácia do processo. Deve-se, sobretudo, promover a expansão dos serviços para áreas mais carentes e reduzir as desigualdades regionais na oferta dos mesmos.

## 2.2 EFLUENTES HOSPITALARES

Quando se fala em saneamento ambiental, deve-se atentar para a complexidade de questões que permeiam este problema. Em se tratando da área de saúde, os resíduos nela produzidos representam um risco em potencial e, neste caso, podem trazer grandes danos, tanto a saúde do usuário, quanto do trabalhador que nela atua, bem como ao próprio meio

ambiente. Os principais organismos nacionais e internacionais de saúde têm se preocupado com a questão dos resíduos de serviços de saúde, desde a sua separação e coleta até o destino final. Porém, fazer valer uma observação técnica ou uma legislação depende também do conhecimento, da motivação e da conscientização das pessoas diretamente envolvidas (TAKAYANAGUI, 1993). Os resíduos hospitalares compreendem uma categoria especial, sendo altamente perigosos, devido às suas características infecciosas e tóxicas. Apesar das práticas de gerenciamento dos resíduos diferirem de hospital para hospital, os problemas são, aproximadamente, os mesmos em todas as unidades de saúde e em todas as fases da gestão, incluindo a separação, a coleta, o acondicionamento, o armazenamento, o transporte, o tratamento e a eliminação (TSAKONA *et al.*, 2007).

Nos estabelecimentos de saúde, entre eles os hospitais, há uma constante geração de resíduos, um consumo elevado de água e o conseqüente descarte de efluentes que necessitam de um destino adequado. A geração de efluentes líquidos nos estabelecimentos de saúde provém de diversas atividades, como por exemplo: águas de lavagem de materiais contaminados, de objetos de uso pessoal, de procedimentos clínicos, dos funcionários de serviços de saúde, dos visitantes destes serviços e dos pacientes. Além disso, os serviços de saúde geram também efluentes a partir das águas servidas de refeitórios, das águas dos dejetos de limpeza de superfícies e pisos, misturadas a soluções desinfetantes, das águas da lavanderia, e das caldeiras, dos resíduos de procedimentos do centro cirúrgico, dos ambulatórios, do laboratório de análises clínicas e anatomopatológico, bem como das instalações sanitárias de funcionários (KÜMMERER, 2001; REINTHALER *et al.*, 2003; EMMANUEL *et al.*, 2005).

A caracterização e os parâmetros sanitários de poluição do tipo de esgoto hospitalar ainda não estão bem definidos, necessitando de mais estudos sobre o tema. Relatos indicam que existem poucas diferenças em relação aos efluentes domésticos e hospitalares com relação à concentração de matéria orgânica, metais e pH. Estudos com águas residuárias urbanas e águas residuais de serviços de saúde encontraram similaridades em relação aos surfactantes e coliformes totais e fecais. Porém, algumas características específicas são atribuídas ao esgoto hospitalar, como a presença de altas concentrações de metais pesados, desinfetantes, agentes citostáticos, medicamentos, hormônios e radioisótopos (KÜMMERER, 2001; EMMANUEL *et al.*, 2005; GAUTAM *et al.*, 2007). Estes produtos e fármacos, entre eles, os resíduos de antibióticos, são capazes de causar impactos ambientais quando presentes no despejo. Al-Ahmad *et al.* (1999) verificaram que muitos antibióticos não são metabolizados completamente após o seu lançamento em sistemas de coleta e tratamento de

esgotos, permanecendo ativos na fase líquida por mais de 20 dias, exercendo ação seletiva sobre a comunidade bacteriana presente. O fenômeno da resistência a antibióticos já é bem conhecido nestes ambientes e o aumento da frequência de bactérias resistentes e seus genes de resistência tem implicações no ambiente e na saúde pública (GUARDABASSI *et al.*, 1998; TZOC *et al.*, 2004).

Outro aspecto relevante a ser discutido quanto ao descarte dos efluentes hospitalares e dos demais estabelecimentos de saúde corresponde às grandes quantidades de microorganismos patogênicos liberados, principalmente, bactérias. Coliformes, *Pseudomonas* sp., *Enterococcus* sp. são bactérias comuns no esgoto (GALLERT *et al.*, 2005). Em uma pesquisa sobre o perfil microbiológico de bactérias em um efluente hospitalar no Rio Grande do Sul, Ortolan *et al.* (2000) identificaram diversos gêneros bacterianos: *Acinetobacter* sp., *Alcaligenes* spp., *Comamonas* sp., *Enterobacter* sp., *Escherichia* sp., *Enterococcus* sp., *Flavobacterium* spp., *Klebsiella* sp., *Leclercia* sp., *Morganella* sp., *Pasteurella* sp., *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., *Serratia* sp., *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas* sp., *Streptococcus* sp. e demais bacilos não fermentadores.

Observou-se que a *Pseudomonas putida* GM6 está associada à remoção de fósforo em uma estação de tratamento do tipo lodo ativado. Ela possui capacidade de acumular fosfatos podendo recuperar sistemas com déficit de remoção de fósforo chegando a taxas superiores a 95%, o que a torna uma espécie interessante para tratamento de efluentes com altos teores de fósforo (CAI *et al.*, 2007).

### 2.2.1 Legislação

No Brasil, existe uma série de legislações e normatizações sobre resíduos sólidos, tanto urbanos quanto hospitalares. Entretanto, ainda carecemos de uma melhor destinação para o esgoto oriundo dos hospitais (VECCHIA *et al.*, 2009). A RDC nº306 de 10 de dezembro de 2004, da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde, estabelece que:

*O gerenciamento dos resíduos de serviços de saúde corresponde um conjunto de procedimentos de gestão, planejados e implementados a partir de bases científicas e técnicas, normativas e legais, com o objetivo de minimizar a produção de resíduos e proporcionar aos resíduos gerados, um encaminhamento seguro, de forma eficiente, visando à proteção dos trabalhadores, a preservação da saúde pública, dos recursos naturais e do meio ambiente (ANVISA, 2004).*

A Resolução CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) nº 358 de 2005, que dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências, define os resíduos de saúde como todos aqueles resultantes de atividades exercidas nos serviços que, devido às suas peculiaridades, necessitam de processos diferenciados em seu manejo, exigindo ou não tratamento prévio à sua disposição final. Nesses serviços de saúde incluem-se todos os serviços relacionados com o atendimento à saúde humana ou animal, inclusive os serviços de assistência domiciliar e de trabalhos de campo, laboratórios, necrotérios, funerárias, serviços de medicina legal, drogarias, farmácias, estabelecimentos de ensino e pesquisa na área de saúde, centros de controle de zoonoses, distribuidores de produtos farmacêuticos e materiais de diagnóstico, serviços de acupuntura, serviços de tatuagem, entre outros.

Sendo assim, todas as unidades geradoras de serviços devem elaborar e implantar um Plano de Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde (PGRSS). Este plano engloba o manejo (segregação e acondicionamento), a identificação, o transporte interno, o armazenamento, o tratamento e a disposição final. Devido à preocupação com a geração e com o gerenciamento dos Resíduos de Serviços de Saúde (RSS) e às implicações decorrentes da emissão de carga poluidora no meio ambiente, a mesma resolução destaca a importância de um tratamento prévio:

*Os resíduos líquidos provenientes de esgoto e de águas servidas de estabelecimento de saúde devem ser tratados antes do lançamento no corpo receptor ou na rede coletora de esgoto, sempre que não houver sistema de tratamento de esgoto coletivo atendendo a área onde está localizado o serviço, conforme definido na RDC ANVISA nº. 50/2002 (ANVISA, 2004).*

No seu artigo 24, a Resolução nº 357 da CONAMA também corrobora a Resolução nº 360 da ANVISA:

*Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e desde que obedçam as condições, padrões e exigências dispostos nesta Resolução (CONAMA, 2005).*

A Resolução ainda estabelece que:

*Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis (CONAMA, 2005).*

*O efluente não devesa causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente (CONAMA, 2005).*

Cabe aos geradores de resíduos de serviço de saúde e aos responsáveis legais, a responsabilidade sobre o gerenciamento dos resíduos desde a geração até a disposição final, de forma a atender aos requisitos ambientais e de saúde pública (Resolução CONAMA nº 358 de 2005).

## 2.3 NÍVEIS, PROCESSOS E SISTEMAS DE TRATAMENTO DE ESGOTOS

Os requisitos a serem atingidos para o efluente são função de legislação específica, que estabelece padrões de qualidade para o efluente e para o corpo receptor. O tratamento dos esgotos é, usualmente, classificado em quatro níveis: preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar tem como objetivo a remoção de sólidos grosseiros, enquanto o tratamento primário visa a remoção de sólidos sedimentáveis e, em decorrência, parte da matéria orgânica. Em ambos os níveis de tratamento predominam mecanismos físicos de remoção de poluentes. No tratamento secundário, em que predominam mecanismos biológicos, o objetivo compreende a remoção de matéria orgânica e, eventualmente, elementos como nitrogênio e fósforo. Para a remoção de poluentes específicos (tóxicos ou compostos não biodegradáveis) ou remoção complementar de poluentes não suficientemente removidos no tratamento secundário, é utilizado o tratamento terciário. A definição da complexidade do tratamento de esgotos em uma determinada estação de tratamento de esgoto (ETE) está associada ao maior nível existente na estação. Assim, uma ETE composta por remoção de sólidos grosseiros (tratamento preliminar), sólidos sedimentáveis (tratamento primário) e matéria orgânica (tratamento secundário) é classificada como uma ETE em nível secundário. O tratamento preliminar deve existir em todas as estações de tratamento de esgotos sanitários. As unidades componentes do tratamento primário podem ou não estar incluídas no fluxograma de estações em nível secundário. O tratamento terciário é raro nos países em desenvolvimento. A remoção de nutrientes e de organismos patogênicos pode ser considerada como integrante do tratamento secundário ou do tratamento terciário, dependendo do processo (VON SPERLING, 2005).

Os sistemas de tratamento de esgotos foram originalmente concebidos para a remoção de matéria orgânica e sólidos. Posteriormente, surgiu a preocupação em reduzir outros constituintes do esgoto como os elementos que podem ser utilizados como nutrientes e os organismos patogênicos. As estações de tratamento devem funcionar como barreiras contra a disseminação de poluentes e, conseqüentemente, diversas enfermidades, principalmente em

países cujos padrões de saúde são precários. Quando se planeja o tratamento de esgotos, é fundamental estudar as características do efluente e sua qualidade, prever se, após tratado, este efluente atenderá aos limites legais, prever os impactos ambientais e dimensionar as unidades de pós-tratamento. A escolha do tratamento depende das condições mínimas estabelecidas para a qualidade da água dos mananciais receptores e sua utilização. Para definir um processo de tratamento deve-se considerar sua eficiência na remoção de demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e coliformes, a disponibilidade de área para sua instalação, os custos operacionais e a quantidade de lodo gerado. Entre os diferentes sistemas de tratamento de esgotos (sistema tanque séptico, filtro anaeróbico, filtro biológico, lagoas de estabilização, etc.), encontram-se os sistemas de lodo ativado. (VON SPERLING, 2005).

### 2.3.1 Sistema de lodo ativado

Este sistema compreende um processo biológico, no qual o esgoto afluente e o lodo ativado são intimamente misturados, agitados e aerados (tanque de aeração), ocorrendo a decomposição da matéria orgânica pelo metabolismo das bactérias presentes. Chamamos lodo ativado aos flocos produzidos em um esgoto bruto ou decantado pelo crescimento de bactérias, na presença de oxigênio dissolvido. Este lodo é acumulado em concentração suficiente devido ao retorno de outros flocos previamente formados. O sistema de lodo ativado é bastante utilizado, principalmente, em situações em que se deseja uma elevada qualidade do efluente com baixos requisitos de área. Porém, a complexidade operacional, o nível de mecanização e o consumo energético são mais elevados. Há diversas variantes do sistema de lodo ativado e, de acordo com a idade do lodo, podem ser divididos em: sistema de lodo ativado convencional, sistema de lodo ativado de aeração prolongada e sistema de lodo ativado de alta taxa ou alta capacidade (raramente empregado).

Estes sistemas são constituídos, basicamente, das seguintes partes/etapas: tanque de aeração ou reator, tanque de decantação e recirculação do lodo. O efluente passa pelo reator, no qual há remoção de matéria orgânica, e depois segue para o decantador. A partir do decantador, o efluente sai clarificado após a sedimentação da biomassa (sólidos) que formam o lodo de fundo. Este lodo contém bactérias ainda ávidas por matéria orgânica e uma parte deste lodo com bactérias é enviada novamente para o reator, através da recirculação do lodo. Com isso, há um aumento da concentração de bactérias em suspensão no tanque (reator) de aeração. O lodo biológico excedente (uma taxa equivalente ao crescimento bacteriano) deve

ser retirado. A alta eficiência deste sistema está relacionada, em grande parte, à recirculação de sólidos. Além da matéria orgânica, o sistema de lodo ativado pode remover nitrogênio e fósforo, mas a remoção de coliformes não é tão eficiente (VON SPERLING, 2005).

### 2.3.1.1 Aeração

As principais formas de aeração são: introdução de ar ou oxigênio no líquido (aeração por ar difuso) e indução de turbulência, na qual se expõe o líquido, na forma de gotículas, ao ar, ocasionando a entrada do ar atmosférico no meio líquido (aeração superficial ou mecânica). Nos sistemas de tratamento biológico aeróbio, o oxigênio deve ser fornecido para a oxidação do carbono orgânico, para fornecer energia para a síntese e respiração das células bacterianas e para a nitrificação. Além disso, o ar injetado mantém uma agitação completa no tanque de aeração, evitando a sedimentação e mantendo os flocos em contato íntimo com os organismos presentes no meio (VON SPERLING *et al.*, 2010).

### 2.3.1.2 Sistemas de lodo ativado convencionais e Sistemas de lodo ativado por aeração prolongada

Nos sistemas de lodo ativado convencionais, a concentração de biomassa no reator é bastante elevada, devido à recirculação dos sólidos (bactérias) sedimentados no fundo do decantador secundário. A biomassa permanece mais tempo no sistema do que o líquido, o que garante uma elevada eficiência na remoção de DBO. Há necessidade da remoção de uma quantidade de lodo (bactérias) equivalente à que é produzida. Este lodo removido necessita de uma estabilização na etapa de tratamento. O fornecimento de oxigênio é feito por aeradores mecânicos ou ar difuso. A montante do reator há uma unidade de decantação primária, de forma a remover os sólidos sedimentáveis do esgoto bruto (VON SPERLING *et al.*, 2010).

O sistema de lodo ativado por aeração prolongada é similar ao sistema convencional, com a diferença de que a biomassa permanece mais tempo no sistema (os tanques de aeração são maiores). Com isto, há menos DBO disponível para as bactérias, o que faz com que elas se utilizem da matéria orgânica do próprio material celular para a sua manutenção. Em decorrência, o lodo excedente retirado já sai estabilizado. Não se incluem usualmente unidades de decantação primária (VON SPERLING *et al.*, 2010).

A seguir, encontra-se um esquema geral dos sistemas de tratamentos de lodo ativado:

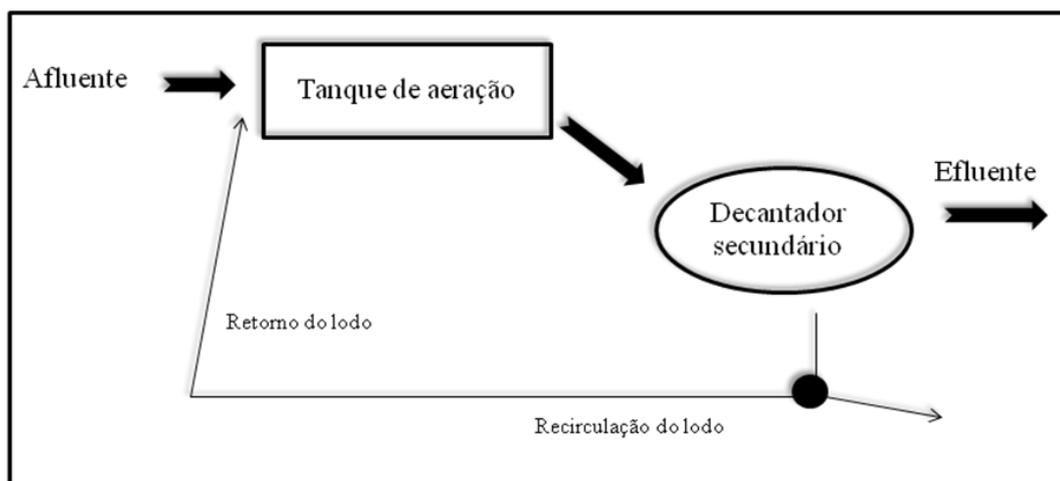


Figura 2.1 Esquema geral dos sistemas de lodo ativado (Fonte: adaptações de Von Sperling *et al.*, 2010)

## 2.4 MICRO-ORGANISMOS INDICADORES - Coliformes totais e fecais

Os micro-organismos estão intimamente associados com a disponibilidade, com a abundância e com a qualidade da água e dos alimentos. Os organismos patogênicos mais comumente encontrados em águas e esgotos podem ser divididos em quatro grupos distintos: vírus, bactérias, protozoários e helmintos (TOZE, 1999). A maioria destes é de origem entérica, ou seja, são excretados junto com o material fecal e liberados nos esgotos, onde entram em contato com os corpos d'água. A quantidade e os tipos de micro-organismos presentes na água podem ser usados para avaliar com segurança a qualidade microbiológica da mesma. A segurança é determinada pela ausência de micro-organismos patogênicos e suas toxinas, pela quantidade de inóculo e pelo tempo de controle ou destruição desses agentes. Testes para organismos indicadores podem ser usados para avaliar também a qualidade microbiológica ou a segurança, quando uma relação entre a ocorrência de um organismo indicador e a provável presença de um patógeno ou toxina tiver sido estabelecida. Micro-organismos indicadores podem ser agrupados em: (i) micro-organismos que não oferecem risco direto à saúde como, por exemplo, leveduras, bolores, termófilos; e (ii) micro-organismos que oferecem um risco baixo ou indireto à saúde como os coliformes totais e coliformes fecais (CUNHA & SILVA, 2006).

Os coliformes são bacilos gram-negativos, em forma de bastonetes, aeróbios ou anaeróbios facultativos, que fermentam a lactose, a 35°C-37°C, produzindo ácido e gás em um prazo de 24-48 horas. São também oxidase-negativos e não formam esporos. Fazem parte deste grupo, predominantemente, as bactérias pertencentes aos gêneros *Escherichia*,

*Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Podem ser encontrados nas fezes, mas também estão presentes em outros ambientes como na vegetação, no solo, etc. Os coliformes fecais (termotolerantes) são bactérias do grupo dos coliformes totais que apresentam capacidade de continuar fermentando lactose, com produção de gás, quando incubadas a temperaturas de 44°C-45°C. O principal representante dos coliformes fecais é a *Escherichia coli* que é, exclusivamente, fecal. Em condições normais, os coliformes não são por si só patogênicos, embora certas linhagens possam causar diarreias e infecções urinárias (TORTORA, 2005; FUNASA, 2006).

A escolha desse grupo de bactérias como indicador de contaminação da água deve-se a fatores como: (i) estão presentes nas fezes de animais de sangue quente, inclusive os seres humanos; (ii) sua presença na água possui relação direta com o grau de contaminação fecal; (iii) são facilmente detectáveis e quantificáveis por técnicas simples e economicamente viáveis; (iv) possuem maior tempo de vida na água que as bactérias patogênicas intestinais; (v) são mais resistentes à ação dos agentes desinfetantes do que os patogênicos. Os métodos para determinar a presença de coliformes na água são baseados na habilidade das bactérias coliformes em fermentar lactose. A técnica dos números mais prováveis, também chamada de técnica dos tubos múltiplos, pode ser utilizada para estimar o número de coliformes. Métodos mais novos utilizam meios de cultura que contém dois substratos: nitrofenil-β-D-galactopiranosídeo (ONPG) e 4-metilumbeliferil-β-D-glucuronide (MUG). Os coliformes produzem as enzimas que atuam sobre estes substratos (TORTORA, 2005; FUNASA, 2006).

## 2.5 ANTIBIÓTICOS

Ao longo da história, a humanidade foi vítima de pandemias como a cólera, a peste, a gripe, a febre tifóide, a tuberculose e outras doenças infecciosas, de modo que a maioria das pessoas, raramente, chegava à idade madura. No século XX, ocorreu uma transformação da nossa forma de entender e tratar as enfermidades infecciosas. Os medicamentos eficazes vêm modificando o enfoque da maior parte das doenças, principalmente, as bacterianas. Em 1928, o cientista britânico Alexander Fleming expandiu mais uma fronteira ao descrever a penicilina. A descoberta de Fleming desencadeou uma revolução sanitária sem precedentes nos anais da ciência médica e, a partir daí, surgiu toda uma família de antibióticos. Hoje em dia, o arsenal de armas antimicrobianas contra as doenças infecciosas é superior a 150 compostos e os custos têm sido enormes. Segundo estimativas, a indústria farmacêutica gasta, anualmente,

500 milhões de dólares em investigações e desenvolvimento de novos compostos para chegar ao mercado (OMS, 2010).

Os antimicrobianos são capazes de interagir com micro-organismos uni ou pluricelulares, causadores de infecções no organismo. A classe dos fármacos com ação antimicrobiana inclui os antibacterianos, antifúngicos, antiprotozoários e antivirais. A definição clássica de um antibiótico é um composto produzido por um micro-organismo que destrói ou inibe o crescimento de outro micro-organismo. Ao longo dos anos, essa definição foi ampliada para incluir os produtos sintéticos e semi-sintéticos. Os antibióticos suficientemente não-tóxicos para o hospedeiro são utilizados como agentes quimioterápicos para o tratamento de doenças infecciosas em seres humanos, animais e plantas. Entre os antibacterianos, encontram-se os sintobióticos, sintetizados em laboratório, e os antibióticos, produzidos por outros micro-organismos (bactérias e fungos). Ambos apresentam ação bactericida ou bacteriostática diante de outros micro-organismos. Neste trabalho e em muitos outros estudos, os termos antibióticos e antimicrobianos são tratados como sinônimos. A ação dos antibióticos é direcionada a alvos particulares nos micro-organismos, destacando-se: a inibição da síntese da parede celular, a inibição da síntese protéica, a inibição de ácidos nucleicos e a alteração da permeabilidade celular. A toxicidade seletiva destes agentes quimioterápicos baseia-se nas diferenças de estrutura e composição química entre as células procarióticas (TORTORA *et al.*, 2005).

Os antibióticos podem ser classificados de diversas formas, sendo a mais comum a classificação de acordo com a ação contra o organismo infectante. Podem ser classificados também de acordo com a estrutura química, a síntese, o efeito no micro-organismo e o espectro de ação. O espectro de ação refere-se à diversidade de organismos afetados pelo agente e, geralmente, o antibiótico pode ter largo (atuando contra bactérias gram-negativas e gram-positivas), intermediário e baixo (com atividade restrita a um grupo de bactérias) espectro de ação (GUARDABASSI *et al.*, 1998; TRABULSI *et al.*, 1999). Os antibióticos formam um grupo diversificado de produtos químicos que pode ser dividido em diferentes subgrupos, como  $\beta$ -lactâmicos, quinolonas, tetraciclina, macrolídeos, sulfonamidas e outros. Na Tabela 2.1, estão listados os principais grupos de antibióticos e seus respectivos mecanismos de ação.

Tabela 2.1 Principais grupos de antibióticos

Classe	Mecanismo de ação
Beta-lactâmicos (ex.: cefalotina, cefotaxima, cefepime, ceftazidima)	Inibem a síntese da parede celular, fixando-se às proteínas fixadoras de penicilinas, impedindo a produção de peptidoglicano.
Cloranfenicol	Inibe a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Aminoglicosídeos (ex.: amicacina, gentamicina, estreptomicina)	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Quinolonas (ex.: ciprofloxacina, norfloxacina)	Inibem a síntese de DNA, fixando-se às enzimas DNA-girases.
Glicopeptídeos (vancomicina)	Inibe a síntese da parede celular.
Macrolídeos, Lincosamidas e Streptogramina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S.
Metronidazol	Rompe o DNA. O mecanismo exato ainda não está esclarecido.
Nitrofurantoína	Atuação sobre o DNA. O mecanismo exato ainda não está esclarecido
Polimixinas (ex.: polimixina B, colistina)	Rompem a membrana celular
Rifampicina	Fixa-se às RNA-polimerases, inibindo a síntese de RNA
Sulfonamidas	Atuam sobre a via do ácido fólico, fixando-se à enzima diidropterato-sintetase
Tetraciclina	Inibem a síntese protéica, fixando-se à subunidade ribossomal 30S
Trimetoprim	Atuam sobre a via do ácido fólico, fixando-se à enzima diidropterato-sintetase

Fonte: Forbes *et al.*, 1998; Koneman *et al.*, 2001.

Um dos problemas emergentes na medicina é o uso inadequado das drogas antimicrobianas. Estimativas indicam que, possivelmente, metade do consumo total de antibióticos é desnecessária (OMS, 2005). Entre muitos exemplos de usos inapropriados de

antimicrobianos, encontram-se: ausência de evidência de infecção; administração de antibióticos para pacientes que estão colonizados (e não infectados) por micro-organismos; administração de antibióticos que são inadequados para o combate aos micro-organismos causadores da doença; desrespeito à posologia; tempo de tratamento inadequado; antibioticoprofilaxia cirúrgica inapropriada, incluindo erro de dose e posologia e desrespeito ao momento de início e de término; administração de antibióticos para tratar infecções resistentes às drogas; administração de fármacos de amplo espectro quando drogas de menor espectro seriam suficientes e disponíveis; administração de múltiplas drogas com espectros superponíveis; entre outros (SOUZA *et al.*, 2008). Berquó *et al.* (2004) destacam ainda que o uso abusivo de antimicrobianos deve-se também à dificuldade para estabelecer a etiologia (viral ou bacteriana) da maioria das infecções respiratórias na prática clínica. Existem também as expectativas dos pacientes, os quais associam infecção à necessidade de uso de antimicrobianos e, finalmente, a necessidade de resolver, de forma definitiva, a queixa do paciente, evitando retornos indesejados ao sistema de saúde.

Usos indiscriminados e desnecessários de antibióticos contribuem para o surgimento de cepas resistentes. Uma das principais preocupações mundiais quanto ao uso racional de medicamentos está relacionada à utilização de antimicrobianos. Nos países em desenvolvimento, poucos recursos são empregados no monitoramento de ações sobre o uso racional destes fármacos. Além disso, existem dados limitados sobre o uso desses agentes em hospitais, não sendo o cenário brasileiro diferente (CASTRO *et al.*, 2002). Estudos estimaram o consumo de antibióticos, em todo o mundo, em 100.000 a 200.000 toneladas por ano (WISE, 2002). Outro grande desafio com relação ao uso de antibióticos diz respeito à qualidade da informação que o paciente detém para o uso do medicamento. A falta de informações durante a consulta, seguida por pouca ou nenhuma orientação no ato da dispensação do medicamento, fazem com que o usuário abandone o tratamento precocemente, perca administrações ou ainda os utilize desnecessariamente (DEL FIOLE *et al.*, 2010).

O uso irresponsável de antibióticos, terapêutica ou profilaticamente, tem favorecido a pressão seletiva, mostrando como resultado a seleção e predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes. A resistência aos antimicrobianos tem avançado e se tornado um grave problema de saúde pública com repercussões econômicas, sociais e políticas, em nível mundial, atravessando barreiras ambientais e étnicas. A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno natural, porém se converte em um problema significativo, quando é acelerada pela utilização incorreta de drogas e descuido humano (OMS, 2010).

### 2.5.1 Antibióticos beta-lactâmicos

A penicilina, o primeiro dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, foi introduzida na prática médica em 1940. Desde então, um grande número de beta-lactâmicos tem sido desenvolvido, sendo todos, estruturalmente, relacionados com a presença de um anel  $\beta$ -lactâmico (WILLIANS, 1999).

Os compostos  $\beta$ -lactâmicos compreendem o maior grupo de antimicrobianos, geralmente com ação bactericida. A base da estrutura molecular destes compostos é o anel  $\beta$ -lactâmico (ROSÁRIO & GRUMACH, 2006), chave para o mecanismo de ação na parede celular através da ligação às enzimas, inativando o conjunto de transpeptidases que catalisam ligações cruzadas na fase final da síntese do peptidoglicano. Os principais grupos  $\beta$ -lactâmicos são as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos.

#### 2.5.1.1 Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos

A parede celular bacteriana é composta de uma rede macromolecular denominada peptidoglicana, que está presente isoladamente ou em combinação com outras substâncias. A peptidoglicana consiste em um dissacarídeo repetitivo unido por polipeptídeos para formar uma rede que circunda e protege a célula. Na maioria das bactérias gram-positivas, há uma membrana celular com uma camada espessa e rígida de peptidoglicanos. Em contraste, as bactérias gram-negativas apresentam uma camada fina de peptidoglicana entre a membrana plasmática interna e a membrana celular lipoprotéica externa (TORTORA *et al.*, 2005).

Nos micro-organismos gram-positivos, os  $\beta$ -lactâmicos não precisam atravessar a membrana plasmática para exercer sua atividade, passando pela camada de peptidoglicano e agindo sobre as transpeptidases na formação da parede celular. Nas bactérias gram-negativas, as duas membranas servem de barreira para os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos, porque seu alvo de ação fica no interior da célula, após a membrana externa e o espaço periplasmático. Mesmo substâncias altamente lipofílicas têm dificuldade de se difundirem para o interior da célula devido à natureza polarizada e assimétrica da membrana celular externa. Os compostos  $\beta$ -lactâmicos são transportados para o interior da célula gram-negativa através, principalmente, de proteínas denominadas porinas. O tamanho, a carga e a hidrofobicidade das moléculas que tentam entrar na célula influenciam a velocidade e efetividade deste transporte (KONEMAN *et al.*, 2001; TORTORA *et al.*, 2005).

Os  $\beta$ -lactâmicos atuam por inibição da síntese da parede celular bacteriana, desencadeando uma reação de acilação com as transpeptidases e, conseqüentemente, promovendo uma ligação cruzada dos polímeros citados anteriormente. As enzimas que participam do processo final da formação da parede celular são as proteínas fixadoras de penicilinas (PBPs – *penicillin-binding proteins*), às quais se ligam, então, os  $\beta$ -lactâmicos. As PBPs impedem a ação de enzimas hidrolases, que ficam livres para lisar a parede celular. As PBPs são diferentes em micro-organismos gram-negativos e gram-positivos e em espécies anaeróbias, o que explica os diferentes espectros de atividade dos  $\beta$ -lactâmicos em diferentes tipos bacterianos (SAMAH-KFOURY & ARAJ, 2003).

Os  $\beta$ -lactâmicos possuem baixa toxicidade, existindo uma grande variedade de compostos e formas disponíveis, os quais são eficazes em um grande número de infecções frequentes. Assim, estes fármacos representam a opção terapêutica antibacteriana mais comumente empregada.

### 2.5.2 Antibióticos no ambiente

Preocupações emergentes com produtos químicos, como os medicamentos (antibióticos), e produtos de higiene pessoal (shampoos, sabonetes, etc) tem gerado novos problemas relacionados à qualidade da água e à gestão da qualidade. Muitos destes medicamentos apresentam baixa biodegradabilidade e, frequentemente, podem atingir águas superficiais (KÜMMERER *et al.*, 2000). O monitoramento dos fármacos residuais está ganhando grande relevância pelo fato de muitas dessas substâncias serem, frequentemente, encontradas em esgotos, podendo, portanto, atingir os corpos d'água receptores, além de gerar impactos sobre a saúde humana e dos demais animais. A partir de meados dos anos 1990, iniciaram-se investigações sobre o destino e as conseqüências destes produtos (HALLING-SØRENSEN *et al.*, 1998; HIRSCH *et al.*, 1999). Os antibióticos foram classificados como um grupo de risco em razão da sua alta toxicidade e seu potencial para o fenômeno da resistência entre populações naturais de bactérias. Os antibióticos têm sido relatados em efluentes hospitalares, águas superficiais, águas subterrâneas, água potável, sedimentos, etc (ZUCCATO *et al.*, 2000; KOLPIN *et al.*, 2004; LINDBERG *et al.*, 2004; KIM & CARLSON, 2006; WATKINSON *et al.*, 2007).

Após a administração, uma parte significativa dos fármacos é excretada por humanos e animais. Estudos demonstram que várias dessas substâncias parecem ser persistentes no meio

ambiente e não são completamente removidas. Com isso, muitos fármacos residuais resistem a vários processos de tratamento convencional de água. Os fármacos são desenvolvidos para ser estáveis, mantendo suas propriedades químicas o bastante para servir a um propósito terapêutico. A utilização abusiva dos antibióticos resulta, basicamente, em dois problemas ambientais: a contaminação dos recursos hídricos e o fato de que alguns micro-organismos podem adquirir resistência a tais agentes antimicrobianos. As bactérias podem fazer, e frequentemente o fazem, mudanças no seu material genético, adquirindo resistência aos fármacos. Assim, uma bactéria presente em um rio que contenha traços de antibióticos pode adquirir resistência a essas substâncias (BILA & DEZOTTI, 2003; DENOBILE & NASCIMENTO, 2004).

Além do consumo em prol da saúde humana e da sua utilização na medicina veterinária, alguns compostos são usados para outros fins: fruticultura, apicultura, produção avícola, aquíicultura, criação de suínos, etc (LOKE *et al.*, 2000). Em alguns países, os antibióticos também são utilizados para promover o crescimento dos animais, quando são utilizados em doses baixas na alimentação animal para melhorar a qualidade do produto (GASKINS *et al.*, 2002). Segundo Nascimento *et al.* (2001), os antibióticos tem sido bastante utilizados nas fazendas e até em muitos casos, de maneira indiscriminada, seja para fins terapêuticos, principalmente visando à cura de mastites, ou ainda incorporados à alimentação animal como suplemento dietético. Tais procedimentos conduzem à presença de resíduos de antibióticos nos produtos, representando um risco ao consumidor e sendo, portanto, um sério problema na área econômica e de saúde pública. A disseminação dos antibióticos residuais pode ocorrer também pelos esterco contaminados por tais fármacos, lavados do solo com as chuvas. Assim, estes podem contaminar o solo, as águas de subsolo e as águas superficiais. Além disso, a descarga direta a partir de processamento de aves e bovinos e da aquíicultura também é possível, e pode contribuir para o aumento da concentração total de antibióticos no ambiente. Diversos estudos têm investigado o potencial de plantas, como algumas hortaliças, cenoura, alface, milho, para absorção de antibióticos a partir do solo (KÜMMERER, 2009). A presença dos antibióticos no ambiente aquático, provenientes da medicina humana, ocorre pela disposição destas drogas excedentes no esgoto, como também pela excreção das mesmas nas fezes e urina que, na maioria das vezes, seguem para uma estação de tratamento. Nestes sistemas, há a produção de lodo, o qual é disperso no campo, contribuindo como fonte de contaminação para os ambientes aquáticos. Além disso, o esgoto tratado é lançado nos corpos hídricos receptores.

### 2.5.2.1 Antibióticos nos efluentes hospitalares

Recentemente, diversos estudos têm demonstrado os riscos ambientais que os medicamentos oferecem em diversos países, considerando os hospitais como as principais fontes (LAPARA *et al.*, 2002; SEBASTINE & WAKEMAN, 2003; SCHWAB *et al.*, 2005; DORNE *et al.*, 2007).

Em geral, as drogas e demais compostos químicos alcançam o esgoto através de urina, fezes e disposição inadequada. Estes produtos são eliminados nos vasos sanitários das residências e outros estabelecimentos comerciais, que contribuem para contaminação dos esgotos por antibióticos. Uma vez que os antibióticos são lançados nos esgotos, mesmo tratados, podem alcançar ambientes naturais (GUARDABASSI *et al.*, 1998; GIGER *et al.*, 2003; BROWN *et al.*, 2006). As estações de tratamento de esgoto só conseguem eliminar parcialmente as concentrações de antibióticos presentes (GIGER *et al.*, 2003). A eliminação ou a persistência de antibióticos no meio ambiente ainda é pouco esclarecida, mas o fato é que muitas destas substâncias podem se dirigir para os corpos hídricos, mesmo após o tratamento do esgoto hospitalar. Os produtos farmacêuticos, em especial os antimicrobianos, podem ter diferentes destinos: as drogas podem ser metabolizadas por micro-organismos a dióxido de carbono e água como, por exemplo, o ácido acetilsalicílico; as substâncias químicas podem sofrer algum processo metabólico ou serem degradadas, parcialmente, como as penicilinas; os compostos lipofílicos e não disponíveis para a degradação podem ficar retidos no lodo; e os compostos podem apresentar-se de forma persistente como clofibrato (RICHARDSON & BOWRON, 1985).

Os hospitais representam uma fonte de liberação de muitas substâncias tais como compostos farmacêuticos, incluindo os antibióticos, no ambiente aquático (RICHARDSON & BOWRON, 1985; JOLIBOIS *et al.*, 2002), mesmo levando em consideração o uso de tais produtos em outros setores fora dos hospitais (KÜMMERER, 2003). A principal fonte de fármacos no ambiente hospitalar compreende as unidades de tratamento intensivo, onde as excretas de pacientes e quimioterápicos lançados nas pias e drenos são direcionados para caixas comuns ao sistema de coleta de esgoto dos hospitais. Hirsch *et al.* (1999) investigaram a ocorrência de vários representantes dos principais grupos de antibióticos em efluentes de estações de tratamento de esgotos. Eles descreveram 18 substâncias antibióticas das classes dos macrolídeos, sulfonamidas, penicilinas e tetraciclinas em várias amostras estudadas. Brown *et al.* (2006) investigaram a presença de seis antibióticos no esgoto hospitalar e no

esgoto doméstico, encontrando estes produtos em uma das amostras de esgoto hospitalar. Nos estudos de Watkinson *et al.* (2009), concentrações significativas de antibióticos foram detectadas em diferentes ambientes aquáticos, desde efluentes até água potável, destacando-se as altas concentrações de beta-lactâmicos nos efluentes hospitalares.

Os antibióticos também têm o potencial de afetar a comunidade microbiana em sistemas de esgoto. A inibição das bactérias de águas residuais pode afetar seriamente a degradação da matéria orgânica e, portanto, os efeitos de agentes antibacterianos na população microbiana são de grande relevância (KÜMMERER, 2009). Os estudos sobre resíduos de antibióticos em efluente hospitalar e em outros nichos ambientais têm sido realizados, principalmente, em países desenvolvidos, enquanto os estudos em países pobres são poucos e esparsos (LARSSON *et al.*, 2007; DUONG *et al.*, 2008; DIWAN *et al.*, 2009). Para Bila & Dezotti (2003), é necessária uma avaliação criteriosa dos efeitos dos antibióticos no meio aquático, além do monitoramento da eficácia da remoção destes fármacos pelos processos convencionais de tratamento de esgotos ou a implantação de tratamento complementar para remoção adequada, principalmente, nos hospitais.

## 2.6 INFECÇÕES HOSPITALARES E PRINCIPAIS BACTÉRIAS ASSOCIADAS

As infecções hospitalares constituem grave problema de saúde pública. Estão entre as principais causas de morbidade e mortalidade e são responsáveis pelo aumento no tempo de hospitalização e, conseqüentemente, elevados custos adicionais para o tratamento do doente. Os hospitais são instituições onde os avanços científicos são utilizados para fornecer aos pacientes os serviços diagnósticos e terapêuticos mais atualizados. Mas a aplicação de tecnologia não é isenta de riscos, estando as infecções hospitalares entre os mais antigos problemas dessas instituições (VERONESI & FOCCACIA, 2004). Segundo a Lei nº. 9.431 de 6 de janeiro de 1997 e a Portaria do Ministério da Saúde 2.616/98, a infecção hospitalar ou nosocomial é qualquer infecção adquirida após a internação de um paciente e que se manifeste durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1997; BRASIL, 1998).

Existem dois grandes grupos de determinantes das infecções hospitalares: os riscos intrínseco e extrínseco. Os riscos extrínsecos correspondem às intervenções – propedêuticas e de monitoração, necessárias à tentativa de se modificar a evolução natural das doenças - e à

qualidade do cuidado dispensado. Já o risco intrínseco é caracterizado pela predisposição dos hospedeiros, determinada pelos distúrbios fisiopatológicos promovidos pela doença de base que levou o paciente à internação (COUTO *et al.*, 2003). As taxas de incidência de infecções hospitalares variam conforme o tipo de unidade considerada e a população atendida.

São diversas as consequências das infecções hospitalares: dano físico e psicológico ao paciente durante a hospitalização, sequelas funcionais, perda de órgãos vitais, perda da vida, danos pessoais e em familiares envolvidos, gastos da sociedade que poderiam ser alocados para outra atividade útil, processos legais e outros litígios, perda de credibilidade do pessoal da saúde e das instituições envolvidas, aumento do custo hospitalar, etc (COUTO *et al.*, 2003).

No Brasil, existem grandes diferenças regionais na prevenção e no controle das infecções hospitalares, incluindo diferenças econômicas, sociais e culturais. Um dos problemas mais graves que atingem os hospitais brasileiros, principalmente os universitários, é a emergência de micro-organismos multirresistentes (PANNUTI & GRIMBAUM, 1995).

As infecções nosocomiais estão relacionadas, principalmente, ao desenvolvimento da resistência bacteriana, devido ao contato prolongado das bactérias com antimicrobianos em ambiente hospitalar, favorecendo o surgimento de cepas multirresistentes (LUNA, 2002). Entre as bactérias gram-negativas mais associadas às infecções hospitalares estão os membros da família *Enterobacteriaceae*, a *Pseudomonas aeruginosa* e o *Acinetobacter baumannii* (ANVISA, 2005). As principais características destas bactérias associadas às infecções hospitalares encontram-se a seguir:

### 2.6.1 *Acinetobacter baumannii*

*Acinetobacter* spp. é um cocobacilo gram-negativo, aeróbio restrito, não móvel e um importante patógeno nosocomial oportunista que acomete pacientes imunocomprometidos. É capaz de resistir ao dessecação e a amplas faixas de temperatura e pH (GUSATTI *et al.*, 2009). A habilidade do *A. baumannii* de sobreviver em superfícies secas e inanimadas aliada à capacidade em adquirir multirresistência aos antimicrobianos contribui para o tempo de sobrevivência no ambiente hospitalar (AYAN *et al.*, 2003). Estes organismos estão particularmente associados à pneumonia, à septicemia, à meningite e à infecção do trato urinário (GAYNES *et al.*, 2005).

*Acinetobacter baumannii* é a espécie mais comum do gênero isolada de amostras clínicas e de ambiente hospitalar. No passado foi considerado de baixa virulência, mas agora é

reconhecido como um importante patógeno hospitalar, afetando, mais frequentemente, pacientes criticamente doentes em unidades de tratamento intensivo (CARVALHO *et al.*, 2009).

### 2.6.2 *Enterobacteriaceae*

Os bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são bactérias anaeróbias facultativas ou aeróbias, não esporuladas, com motilidade variável, oxidase-negativas e que crescem em meios básicos, meios ricos e ou meios seletivos (ANVISA, 2005; MURRAY *et al.*, 2003). Do ponto de vista bioquímico, caracterizam-se pela capacidade de reduzir nitrato a nitrito, fermentar a glicose com produção de ácido ou ácido e gás (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2003).

Estes micro-organismos estão distribuídos amplamente na natureza, sendo encontrados na água, solos, plantas e no trato intestinal de seres humanos e outros animais (KONEMAN *et al.*, 2001; MURRAY *et al.*, 2003). São os maiores componentes da flora normal do intestino, mas são relativamente incomuns em outros sítios do corpo (MURRAY *et al.*, 2003). As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica e são responsáveis por de cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias (ANVISA, 2005).

Com relação às infecções hospitalares, os gêneros de enterobactérias mais frequentemente isolados, são: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Serratia* spp (ANVISA, 2005). A *Escherichia coli* é a espécie mais isolada, sendo o patógeno mais comum nas infecções urinárias e, além disso, pode estar relacionada a pneumonia em pacientes imunossuprimidos, bacteremias e infecções intestinais. No gênero *Klebsiella*, *K. pneumoniae* é isolada com maior frequência de amostras clínicas, podendo causar pneumonia, meningite, infecções urinárias e septicemia (KONEMAN *et al.*, 2001). No gênero *Enterobacter*, as espécies mais isoladas são *E. aerogenes* e *E. cloacae*, podendo estar associadas a uma variedade de infecções oportunistas.

### 2.6.3 *Pseudomonas aeruginosa*

É um bacilo gram-negativo não-fermentador considerado um dos principais agentes de infecção hospitalar. Encontra-se dentro da família *Pseudomonadaceae*. Possui grande versatilidade nas necessidades nutricionais e energéticas, o que permite o crescimento rápido em, praticamente, todos os meios de cultura utilizados em laboratório (MURRAY *et al.*, 2003).

É um micro-organismo ubiqüitário, sendo encontrado no solo, na água, em vegetais, em animais, em alimentos e nos diversos ambientes hospitalares. Dificilmente, causa infecção em indivíduo imunocompetente, porém é um dos principais agentes de infecção em indivíduos imunodeprimidos. São bactérias aeróbias ou microaerófilas, que possuem forma de bastão na grande maioria. A motilidade pode ocorrer por um ou vários flagelos polares e, geralmente, são móveis. Sua obtenção de energia a partir dos carboidratos implica em um metabolismo oxidativo, o que define a sua inclusão no grupo dos microorganismos não fermentadores (TRABULSI *et al.*, 1999).

A *Pseudomonas aeruginosa* é causa importante de infecções nosocomiais no trato respiratório, incluindo pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções em pacientes queimados. Sua importância clínica está relacionada à ampla expressão de fatores de virulência e às resistências intrínseca e adquirida a várias classes de antibióticos decorrente de distintos mecanismos (TRABULSI *et al.*, 1999).

Bactérias associadas às infecções hospitalares apresentam diversas origens. Esta origem pode ser externa ao hospital, quando trazidas por visitantes, colaboradores, etc ou se manifestar via micro-organismo da própria microbiota do paciente devido ao desequilíbrio nos seus mecanismos de defesa (OPAS, 2000).

Devido à importância dos bastonetes gram-negativos multirresistentes como agente de infecções hospitalares, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre essas amostras tornam-se muito importantes. A identificação de subpopulações de organismos associadas a altos níveis de resistência pode desencadear estratégias que previnam a sua disseminação e melhorem a terapia como um todo. Nos últimos anos, diversas técnicas moleculares foram desenvolvidas, sugeridas como importantes ferramentas tanto na epidemiologia quanto na tipagem de espécies bacterianas (TENOVER *et al.*, 1997).

Os métodos de tipagem epidemiológica são utilizados atualmente nas investigações de surtos, para a determinação de clones e para o monitoramento de reservatórios de micro-organismos, auxiliando assim a vigilância epidemiológica e a circulação de clones epidêmicos em uma determinada população. Técnicas direcionadas para análise do polimorfismo do genoma bacteriano, entre elas, a eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE), constituem as melhores opções para a tipagem comparativa de amostras de uma mesma espécie obtidas em curtos períodos de tempo. Desse modo, o PFGE permanece como método de referência devido ao seu alto poder discriminatório e maior reprodutibilidade (TOSIN *et al.*, 2003).

A técnica de eletroforese em campo pulsado (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* - PFGE) foi descrita no final da década de 80 como uma ferramenta poderosa, especialmente para o estudo do genoma e da diversidade e baseia-se na utilização de um campo elétrico que tem direção e intensidade periodicamente alternadas. Assim o PFGE é capaz de separar moléculas de DNA de 1Kb a 12Mb e tem sido referido como um dos métodos mais adequados para o estudo das relações epidemiológicas de cepas pertencentes a diversas espécies de micro-organismos. A sensibilidade desta metodologia em detectar rearranjos no genoma bacteriano resulta na adequada detecção de diferenças mínimas em genomas de clones semelhantes, e desta maneira, torna sua aplicação coerente em investigações de surtos e estudos de diversidade (OLIVE & BEAN, 1999).

## 2.7 RESISTÊNCIA BACTERIANA

As bactérias surgiram na terra há cerca de 3,5 bilhões de anos, em ambiente hostil com temperaturas altíssimas, radiações ultravioletas e cósmicas, tempestades e falta de nutrientes. Elas superaram tudo e evoluíram para ocupar hoje todos os habitats, até aqueles com condições mais extremas. Sua grande capacidade de adaptação está associada à estrutura genômica, que garante a troca de genes entre as bactérias, usando para isso elementos não cromossômicos, como plasmídeos e transposons, e até bacteriófagos. Estes últimos podem destruir as bactérias hospedeiras, mas podem carrear e espalhar genes bacterianos (ANTONIO *et al.*, 2009). A resistência bacteriana é um fato natural, pois há bactérias naturalmente resistentes a certos antimicrobianos. A prevalência de cepas resistentes a antibióticos convencionais vem desafiando o tratamento efetivo de doenças infecciosas causadas por tais micro-organismos (NIEDERMAN, 2000).

O surgimento de cepas bacterianas resistentes aos diversos tipos de antimicrobianos, correlacionado com a concentração destes fármacos no organismo e no ambiente, vem sendo relatado desde a descoberta dos antibióticos (MARTINEZ & BAQUERO, 2000). Segundo Madigan *et al.* (2004), a aquisição de resistência às drogas antimicrobianas corresponde à capacidade de um organismo de resistir a um agente quimioterápico ao qual este é, normalmente, sensível. A resistência a antimicrobianos apresentada pelas bactérias ocorre devido às características codificadas geneticamente, podendo estas ser intrínsecas ou adquiridas. A resistência intrínseca é aquela resultante da genética, estrutura e fisiologia natural do micro-organismo. A resistência adquirida resulta da alteração da estrutura e fisiologia celular, por mudanças genéticas do micro-organismo. A resistência pode ser adquirida por mutação genética, transferência de genes de outros organismos, ou ainda de uma associação de ambas. Ao contrário da resistência intrínseca, ocorre apenas em algumas cepas de um grupo ou espécie de organismos (FORBES *et al.*, 1998; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003).

A maioria das estratégias de resistência bacteriana é codificada por um ou mais genes, que são transferidos por meio de diversos mecanismos. Estes genes de resistência bacteriana variam de acordo com sua localização, tipo de transferência e expressão. Os genes de resistência estão localizados no cromossomo bacteriano, o que confere certa estabilidade genética ao micro-organismo, ou nos plasmídeos extra-cromossomiais (DAVISON, 1999; KONEMAN *et al.*, 2001; DZIDIC & BEDEKOVIC, 2003; KÜMMERER, 2009b). Sob certas condições, os plasmídeos são uma vantagem para as células. Os plasmídeos, além das funções essenciais, podem transportar genes para atividades de resistência aos antibióticos, tolerância a metais tóxicos, produção de toxinas e síntese de enzimas (TORTORA *et al.*, 2005).

Há certa mobilidade de genes de resistência aos antibióticos entre bactérias da mesma espécie e também entre espécies distintas. Os elementos genéticos como plasmídeos podem também ser transmitidos para outras bactérias de diferentes espécies através de mecanismos específicos de recombinação e troca, denominados de transferência horizontal (DAVISON, 1999). A transferência horizontal de genes é um processo comum na natureza, podendo ser utilizada até mesmo em sistemas biotecnológicos (MUELA *et al.*, 1994). Existem muitas evidências de que a transferência horizontal possa ser um fator relevante na presença de cepas patogênicas no meio ambiente (DAVISON, 1999; SCHMIDT *et al.*, 2001).

Existem alguns importantes mecanismos de transferência de material genético: conjugação, transformação, transdução e transposição. O mecanismo mais comum pelo qual

os genes de resistência são transferidos é a conjugação (SENGUPTA *et al.*, 2011), ou seja, a transferência de genes que requer contato célula a célula. Para que aconteça a conjugação, é necessário contato célula a célula, através de um *pilus* sexual especializado, codificado por um plasmídeo denominado F. Uma vez que o contato é estabelecido, o plasmídeo F é replicado e uma das cadeias simples de DNA plasmidial passa para a célula receptora através do *pilus*. A cadeia simples começa a ser replicada à medida que entra na célula, havendo, ao final do processo, duas células contendo plasmídeos conjugativos completos. O plasmídeo pode ser incorporado ao cromossomo bacteriano (TORTORA *et al.*, 2005). No caso da transformação, há captação de DNA solúvel no meio por células receptoras competentes. O mecanismo de transdução compreende a transferência genética com auxílio de bacteriófagos, enquanto que a transposição é a transferência de genes dentro de uma mesma célula através de transposons (DNA) (LUZ, 2008).

As células bacterianas podem impedir a ação dos agentes antimicrobianos por diversos mecanismos: alteração da proteína alvo, inativação enzimática, alteração da permeabilidade da membrana e mecanismo de efluxo. A alteração da permeabilidade da membrana, comumente observada em gram-negativos, corresponde à alteração dos canais de porinas, modificando a penetração e, conseqüentemente, a ação dos diferentes antibióticos. A alteração da proteína alvo está associada à alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria, diminuindo assim a afinidade da droga pelo sítio e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana. Quanto à inativação enzimática, bactérias podem produzir enzimas como, por exemplo, as  $\beta$ -lactamases, as quais neutralizam as drogas e seus efeitos antibióticos. Outro mecanismo é o de efluxo ou bomba de efluxo que corresponde à propriedade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, promovendo uma ação não-efetiva do antimicrobiano (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A pressão de seleção exerce um papel importante na transferência e manutenção de genes de resistência aos antibióticos (SMALLA *et al.*, 2000). A exposição de bactérias aos antibióticos confere uma vantagem ecológica às cepas resistentes. Essa pressão seletiva antibiótica pode acontecer no hospedeiro, em consequência da quimioterapia, ou no ambiente. Outras substâncias, além dos antibióticos, também possuem potencial de selecionar bactérias resistentes. Entre estas substâncias, dois grupos não antibióticos destacam-se: metais pesados e biocidas. As bactérias podem ter mecanismos inespecíficos de resistência para diferentes substâncias, incluindo metais pesados, biocidas e antibióticos. Em todos estes casos, a

exposição para uma substância resulta na co-seleção de bactérias resistentes à outra substância. (GUARDABASSI & DALSGAARD, 2002).

A ocorrência de ambientes fortemente seletivos para os microrganismos, como recuperados de efluentes hospitalares, gera um aumento da frequência de detecção de genes de resistência bacteriana. Estudos têm demonstrado que efluentes hospitalares apresentam níveis mais elevados de bactérias entéricas resistentes aos antimicrobianos do que efluentes derivados de outras fontes e a concentração de antimicrobianos presente no esgoto hospitalar também é superior, criando um ambiente com forte pressão seletiva (LINTON *et al.*, 1974). Além disso, as precárias condições de saneamento básico e a falta de tratamento dos efluentes hospitalares podem estabelecer rotas de disseminação de bactérias e seus respectivos elementos genéticos relacionados à resistência, tais como os plasmídeos, que podem amplificar o problema (MEIRELLES-PEREIRA *et al.*, 2002; BAQUERO, 2004). Segundo Baquero *et al.* (2008), existem os chamados reservatórios genéticos, locais potenciais para trocas genéticas e, conseqüentemente, para a disseminação da resistência antimicrobiana devido à alta conectividade biológica e à presença de seleção específica. Entre estes reservatórios, encontram-se os esgotos hospitalares. A presença de bactérias resistentes no esgoto depende, portanto, da estação de tratamento de esgoto, da população bacteriana estudada, do agente antimicrobiano e da concentração do mesmo.

## 2.8 ENZIMAS BETA-LACTAMASES

A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos pode ocorrer por três vias já citadas anteriormente: inativação enzimática, alteração de receptores e alteração da permeabilidade da membrana, sendo a produção de enzimas a via mais comum e de maior relevância. As beta-lactamases hidrolisam o anel beta-lactâmico, impossibilitando a atividade antimicrobiana. Estas enzimas clivam o anel beta-lactâmico, alterando assim a estrutura do antimicrobiano, que não consegue se ligar efetivamente às PBPs, o que permite que a síntese da parede celular bacteriana continue normalmente (FORBES *et al.*, 1998) A especificidade destas enzimas aos beta-lactâmicos determina a eficácia da hidrólise dos mesmos. A capacidade ou não da beta-lactamase de conferir resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos de amplo espectro irá depender da quantidade de enzima produzida pelo micro-organismo, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa (LIVERMORE, 1991).

As beta-lactamases foram originadas, provavelmente, devido à pressão seletiva exercida por organismos existentes no solo, produtores de compostos beta-lactâmicos (BRADFORD, 2001; KONEMAN *et al.*, 2001). A síntese destas enzimas pode ser cromossômica (constitutiva) ou mediada por plasmídeos (indutiva). A mobilidade genética ainda pode ser ampliada por meio de transposons que transportam os respectivos genes dos plasmídeos para os cromossomos (TENOVER *et al.*, 1997). A produção destas enzimas pode ser induzida tanto pela presença de beta-lactâmicos como de precursores da parede celular no meio extracelular (KONEMAN *et al.*, 2001; SAMAHA-KFOURY & ARAJ, 2003).

As enzimas beta-lactamases já foram classificadas de três formas diferentes. A primeira classificação foi sugerida em 1973, baseada no perfil do substrato das enzimas e na localização dos genes codificadores das enzimas. Atualmente, têm sido consideradas duas classificações: uma proposta por Ambler em 1980; e outra desenvolvida por Bush, Jacoby e Medeiros, em 1995 (Tabela 2.3). A primeira está baseada na estrutura molecular e na homologia nas sequências de aminoácidos, resultando em quatro grupos (A, B, C e D). A Classificação de Bush se baseia nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequências nucleotídicas, separando as enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos.

Tabela 2.2 Classificação das beta-lactamases

Classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995)		Classificação de Ambler (1980) (Classe Molecular)	Características
Grupo Funcional	Subgrupo		
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias gram-negativas. Conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico. Inclui AmpC de gram-negativas e MIR-1.
2	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico.
	2b	A	$\beta$ -lactamases de espectro estendido de bactérias gram-negativas. Inclui TEM-1, TEM-2 e SHV-1.
	2be	A	$\beta$ -lactamases de espectro estendido. Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Inclui as ESBLs.
	2br	A	$\beta$ -lactamases resistentes aos inibidores de $\beta$ -lactamases derivadas de TEM.
	2c	A	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina.

Tabela 2.2 (Continuação)

	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinases inibidas por ácido clavulânico
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são inibidas por ácido clavulânico
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamases que conferem resistência aos carbapenêmicos e todos os tipos de $\beta$ -lactâmicos, exceto os monobactâmicos. Este grupo não é inibido pelo ácido clavulânico.
4		ND	Penicilinases não seqüenciadas e não categorizadas em nenhum dos grupos descritos.

Fonte: Bush, 2001.

### 2.8.1 Beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL)

As ESBLs estão classificadas dentro do grupo funcional 2, segundo Bush *et al.* (1995), e da classe A de Ambler (1980). Estas enzimas são capazes de hidrolisar cefalosporinas e monobactâmicos, mas não as cefamicinas e os carbapenêmicos (KNOTHE *et al.*, 1983; BUSH *et al.*, 1995; DU BOIS *et al.*, 1995; GOLD & MOELLERING, 1996; BUSH, 2001). São inibidas por compostos como o ácido clavulânico (clavulanato), o sulbactam e/ou o tazobactam (BUSH *et al.*, 1995; BRADFORD, 2001; PFALLER & SEGRETI, 2006).

Foram derivadas de mutações nos genes que codificam outras  $\beta$ -lactamases, *bla*<sub>TEM-1</sub> e *bla*<sub>SHV-1</sub>, que resultaram na substituição de aminoácidos, alterando assim seus substratos específicos. As ESBLs diferem de suas enzimas de origem por uma a sete substituições e algumas deleções de aminoácidos que alteram a configuração e as propriedades do seu sítio de ação (BRADFORD, 2001). As enzimas ESBL possuem, geralmente, localização plasmidial, porém podem ter sido originadas nos cromossomos, já que muitas enterobactérias contêm enzimas cromossômicas constitutivas. Os plasmídeos que carregam os genes codificadores de ESBL podem conter também determinantes de resistência para outros grupos de antimicrobiano: quinolonas, sulfonamidas, trimetoprim, cloranfenicol, tetraciclina e aminoglicosídeos (BRADFORD, 2001; GNIADKOWSKI, 2001; COQUE *et al.*, 2002; STÜRENBURG & MACK, 2003). Assim, a produção de ESBL é frequentemente acompanhada por multirresistência aos antibióticos, de forma que as opções terapêuticas ficam, muitas vezes, limitadas aos carbapenêmicos.

As enzimas ESBL são agrupadas e denominadas de acordo com a similaridade com outras enzimas precursoras e/ou com grupos já conhecidos. A maioria delas é derivada das beta-lactamases dos tipos TEM e SHV. Outros tipos de ESBL, relevantes clinicamente, são: CTX-M, OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO, GES e BES.

Cepas produtoras de ESBL têm sido descritas em diversos países, inclusive no Brasil. A importância epidemiológica das ESBLs é refletida na sua expansão clonal, sua localização plasmidial e em repetidos eventos mutacionais (LIVERMORE & WOODFORD, 2006). Embora ESBLs tenham sido descritas em uma variedade de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* de diferentes lugares do mundo, elas são, frequentemente, identificadas em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*. De acordo com dados do SENTRY para o Brasil, existe uma alta frequência de isolados produtores de ESBL: 9,1% para *E. coli* e 50,3% para *K. pneumoniae* (SADER *et al.*, 2001).

Inicialmente, micro-organismos produtores de enzimas ESBLs foram isolados de pacientes hospitalizados e podem sobreviver por longos períodos nos hospitais, ocasionando surtos. Atualmente, já existem casos de ESBL encontrados em pacientes da comunidade (RODRÍGUEZ-BAÑO *et al.*, 2004; MINARINI *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2010). Mesa *et al.* (2006) identificaram *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs em diversas amostras ambientais como fezes de indivíduos saudáveis, alimentos, fazendas de agropecuária e esgotos, sugerindo que a comunidade funciona com reservatório de cepas produtoras de ESBL e alertando para a expansão global destas enzimas.

### 2.8.1.1 TEM

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2 (PATERSON & BONOMO, 2005). As  $\beta$ -lactamases TEM-1 são enzimas comumente encontradas em bactérias gram-negativas, localizadas normalmente no transposon *Tn3*, o qual é muito pouco seletivo, permitindo uma série de transposições e rearranjos envolvendo seu gene codificador *bla*<sub>TEM</sub> (CAO *et al.*, 2002; SANGUINETTI *et al.*, 2003; BIENDO *et al.*, 2005; ENDIMIANI, 2005). O fato de TEM-1 e outros derivados serem mediados por plasmídeos e transposons facilita a disseminação para outras espécies de bactérias (BRADFORD, 2001). A primeira  $\beta$ -lactamase do tipo TEM a expressar o fenótipo ESBL foi a TEM-3, descrita em 1987. Após isso, muitos outros derivados de TEM foram relatados, sendo alguns resistentes a inibidores de  $\beta$ -lactamases e a grande maioria com fenótipo ESBL (LIVERMORE, 1995; BRADFORD, 2001).

As combinações das substituições de aminoácidos que ocorrem em posições limitadas na enzima TEM resultam em diversas alterações nos fenótipos ESBL, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas como ceftazidima e cefotaxima (BRADFORD, 2001; PFALLER & SEGRETI, 2006). As TEM-beta-lactamases resistentes aos inibidores, em sua maioria, surgem independentemente da ação de ESBL, sendo relativamente inativas contra oximino-cefalosporinas. Porém algumas variantes (exemplos: TEM-50 e TEM-68) retêm ambas as atividades (STÜRENBERG & MACK, 2003; PATERSON & BONOMO, 2005). Embora as  $\beta$ -lactamases do tipo TEM sejam, frequentemente, encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, elas também são relatadas em outras espécies de bactérias gram-negativas como *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Samonella* spp. (BRADFORD, 2001; ESSACK *et al.*, 2001).

### 2.8.1.2 SHV

As enzimas do grupo SHV são frequentemente encontradas em cepas de *K. pneumoniae*, nas quais *bla*<sub>SHV-1</sub> ou outro gene relacionado estão integrados ao cromossomo bacteriano. São responsáveis por aproximadamente 20% da resistência à ampicilina mediada por plasmídeos nesta espécie. Podem ser diagnosticadas em outras espécies de *Enterobacteriaceae* e em *Pseudomonas aeruginosa* (SAMAH-KFOURY & ARAJ, 2003; SANGUINETTI *et al.*, 2003; PFALLER & SEGRETI, 2006). Ao contrário das enzimas TEM, existem relativamente poucos derivados da SHV-1. Grande parte das variantes desta enzima com fenótipo ESBL é caracterizada pela substituição de uma serina por uma glicina na posição 238 (LIVERMORE, 1995). A SHV-2 é a primeira  $\beta$ -lactamase capaz de hidrolisar os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro (BRADFORD, 2001).

Grande parte das  $\beta$ -lactamases SHV possui fenótipo ESBL, com exceção de SHV-4 e SHV-10, os quais possuem fenótipo de resistência aos inibidores de  $\beta$ -lactamases. Estas enzimas mantêm, parcialmente, sua habilidade para hidrolisar as penicilinas, porém sua atividade contra cefalosporinas é reduzida (BRADFORD, 2001; HOWARD *et al.*, 2002; STÜRENBURG & MACK, 2003). Assim como as enzimas do grupo TEM, as SHV- $\beta$ -lactamases possuem maior atividade contra a ceftazidima do que contra a cefotaxima, enquanto que o tipo CTX-M (cefotaximase) tem alto nível de resistência à cefotaxima e baixa atividade contra a ceftazidima (COQUE *et al.*, 2002). A família de SHV é mais frequente em *K. pneumoniae*, porém também já foi relatada em *Citrobacter* sp., *E. coli*, *P. aeruginosa* (BRADFORD, 2001).

### 2.8.1.3 CTX-M

Recentemente, um grupo crescente de enzimas vem contribuindo com a epidemiologia das ESBLs: as  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M. A primeira CTX-M- $\beta$ -lactamase (CTX-M-1) foi isolada na Europa no final dos anos 1980 tendo, em seguida, ocorrido uma rápida disseminação (STÜRENBURG & MACK, 2003; SOGE *et al.*, 2006; ROSSOLINI *et al.*, 2008). Desde o primeiro relato, uma grande variedade de CTX-M tem sido reportada em várias áreas geográficas e em diversos isolados bacterianos de pacientes hospitalizados e de pacientes da comunidade (BONNET, 2004; SASAKI *et al.*, 2010).

Amostras expressando CTX-M- $\beta$ -lactamases vêm sendo descritas em muitas partes do mundo, porém com maior frequência em epidemias focais na Europa Ocidental, América do Sul e Japão (GNIADKOWSKI *et al.*, 1998; SABATÉ *et al.*, 2000). Entre os grupos de ESBL, as CTX-M são, de longe, as mais bem sucedidas em termos de disseminação e o seu impacto é, atualmente, comparável ou mesmo superior ao impacto das ESBL tipo SHV e TEM (ROSSOLINI, *et al.*, 2008).

Este grupo de enzimas é codificado por plasmídeos, pelo gene *bla*<sub>CTX-M</sub>, e tem como substrato preferencial a cefotaxima e a ceftriaxona. Outra característica desta enzima é ser melhor inibida, entre os inibidores de beta-lactamases, pelo tazobactam do que pelo sulbactam e pelo ácido clavulânico. As CTX-M- $\beta$ -lactamases apresentam cerca de 40% de identidade com as  $\beta$ -lactamases TEM e SHV. Provavelmente, foram originadas a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascobarta*, uma vez que possuem alto grau de homologia entre si (BRADFORD, 2001; BONNET, 2004).

Estudos filogenéticos sobre a família CTX-M reportam os 4 principais tipos desta enzima: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 (BONNET *et al.*, 2004; ROSSOLINI *et al.*, 2008). Precursores de genes que codificam enzimas dos grupos CTX-M-1 e CTX-M-2 foram detectados em amostras de *Kluyvera ascorbata*, enquanto que os precursores dos genes que codificam CTX-M-8 e do grupo CTX-M-9 ocorrem em cepas de *Kluyvera georgiana* (ROSSOLINI *et al.*, 2008).

### 2.8.2 Carbapenemases do tipo KPC

As carbapenemases pertencem a uma família de enzimas com ampla atividade hidrolítica à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (QUEENAN & BUSH, 2007). Distinguíveis pela conformação do seu sítio ativo, as carbapenemases pertencem à classe A de Ambler (carbapenemases de classe A), classe B (metalo- $\beta$ -lactamases) e classe D (oxacilinas/ $\beta$ -lactamases) (PEIRANO *et al.*, 2009; DIENSTMANN *et al.*, 2010). Quanto às carbapenemases de classe A (serino-carbapenemases), três grandes famílias de enzimas estão incluídas: NMC/IMI, SME e KPC, que se caracterizam por hidrolisar uma variedade de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam e podem ser inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN & BUSH, 2007). A enzima KPC é uma serino-carbapenemase de grande importância.

As KPC- $\beta$ -lactamases hidrolisam penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos (aztreonam) e carbapenêmicos e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam. A ocorrência de KPC tem sido um grande problema. O primeiro relato desta enzima ocorreu na Carolina do Norte, Estados Unidos, em 1996 e foi isolada de *K. pneumoniae*, sendo identificada como KPC-1 (NORDMANN *et al.*, 2009). Tempos depois, a variante KPC-2 foi descrita, também em uma *Klebsiella* sp., porém uma recente correção da sequência KPC-1 indicou que  $bla_{KPC-1}$  e  $bla_{KPC-2}$  são idênticas. Mutações no gene estrutural da enzima têm resultado em novas variantes. Sete variantes de  $bla_{KPC}$  foram detectadas: KPC-1 a KPC-7 em *Enterobacteriaceae*, com exceção de KPC-5, que foi descrita em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* (PEIRANO *et al.*, 2009). A análise genética dos genes  $bla_{KPC}$  indica que sua mobilidade e disseminação estão relacionadas a um transposon *Tn3*-based, *Tn4401*, que é transportado por grandes plasmídeos variando em tamanho e estrutura (NAAS *et al.*, 2008; NORDMANN *et al.*, 2009).

As enzimas KPCs têm sido frequentemente encontradas em *K. pneumoniae*, porém vêm sendo relatadas em diversas espécies de enterobactérias em diferentes regiões do mundo, incluindo Israel, China, Europa, Américas Central e do Sul e, recentemente, no Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2009). No Brasil, a ocorrência de KPC vem sendo relatada em São Paulo, Rio de Janeiro, Recife e demais estados (MONTEIRO *et al.*, 2009; PEIRANO *et al.*, 2009). Durante estes anos, desde a primeira identificação, cepas bacterianas produtoras de KPC vêm sendo identificadas apenas em pacientes hospitalizados. A disseminação de bactérias produtoras de KPC é preocupante, uma vez que, as opções terapêuticas são muito restritas.

Nesta perspectiva, as bactérias resistentes estabelecem um grande desafio à terapia antimicrobiana e a disseminação das mesmas e seus genes de resistência trazem, ao cenário atual, a necessidade de detectar tais micro-organismos no ambiente, principalmente, no esgoto hospitalar. Além disso, devido às características dos efluentes hospitalares, torna-se necessário conhecer melhor o conteúdo destes antes da sua destinação final. O objetivo do presente trabalho é investigar a presença de bactérias resistentes nos efluentes hospitalares, através de testes de sensibilidade aos antimicrobianos. Posteriormente à etapa de identificação destas bactérias, segue-se a detecção da resistência aos antimicrobianos e da produção de enzimas  $\beta$ -lactamases de amplo espectro e carbapenemases do tipo KPC, principais mecanismos de resistência, e seus determinantes genéticos. E, por fim, pretendeu-se avaliar se há alguma correlação genética entre os isolados de esgoto e os isolados obtidos de pacientes.

## **3 OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Identificar bactérias multirresistentes, através de métodos fenotípicos e genotípicos, em amostras de águas residuais coletadas em um sistema de tratamento de esgoto hospitalar na cidade do Rio de Janeiro.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Detectar e quantificar coliformes totais e fecais nas amostras;
  
- Identificar bioquimicamente as amostras bacterianas isoladas;
  
- Analisar o perfil de suscetibilidade das amostras bacterianas frente aos diferentes grupos antimicrobianos;
  
- Analisar fenotipicamente a produção de ESBL e carbapenemase do tipo KPC;
  
- Detectar os determinantes genéticos das principais beta-lactamases através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR);
  
- Analisar genotipicamente as cepas produtoras de ESBL através da técnica de eletroforese em gel de campo pulsado, a fim de rastrear possíveis similaridades genéticas entre isolados do esgoto e isolados clínicos.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DO ESGOTO

A estação de tratamento de esgotos (ETE) do presente trabalho presta serviços à um hospital situado na cidade do Rio de Janeiro – RJ, Brasil. O hospital é localizado no bairro da Barra da Tijuca, pertencendo à Área Programática 4 (AP-4), que abrange os bairros Barra da Tijuca, Recreio dos Bandeirantes, Jacarepaguá e Cidade de Deus, segundo a Secretaria Municipal de Saúde. Esta unidade de saúde possui uma área de 10.700 metros quadrados de área construída em um terreno de 32.500 m<sup>2</sup> e é composta por 1205 profissionais, além de estagiários, internos, residentes e pós-graduandos. Existe também uma unidade materno-infantil no hospital em questão, abrigada em 6.320 m<sup>2</sup> de área construída.

A estação de tratamento utiliza o sistema de lodo ativado com aeração prolongada. Na ETE, também há um tratamento para desinfecção do efluente tratado com introdução de hipoclorito de sódio (NaOCl), cuja concentração de cloro aplicada foi em torno de 1 mg/L. Os esgotos que foram tratados são produtos das mais diversas atividades das unidades que compõem este estabelecimento de saúde, como laboratórios, unidades de reabilitação, unidades neonatais, diálise, internação, cirurgia, ambulatórios, lavanderia e refeitório.

No período de julho a dezembro de 2008, 8 coletas foram realizadas em 3 pontos distintos do sistema de tratamento, totalizando 24 amostras a serem analisadas. Os pontos de coleta compreendem: afluente (esgoto bruto que vem da rede coletora), efluente tratado (após o decantador secundário), e efluente clorado (após a cloração/desinfecção).

As coletas foram feitas pela manhã, em decorrência da necessidade de processar rapidamente as amostras no laboratório de análise. O volume coletado em cada ponto foi de 1L, armazenado em frascos de plástico estéreis, conservado e transportado para o Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - IOC/FIOCRUZ de acordo com as especificações do Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998). Esta etapa do trabalho teve a colaboração do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP/FIOCRUZ).

## 4.2 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS

Para a quantificação de coliformes totais e fecais (*E. coli*), foi utilizado o método cromatogênico do kit Colilert® (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA). Este método apresenta maior rapidez de detecção se comparado a outros métodos tradicionais como a técnica de tubos múltiplos, obtendo resultado no prazo máximo entre 24 e 28 horas após a incubação. Os meios de cultura utilizados, prontos para processamento em kits, contêm dois substratos: nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) e 4-metilumbeliferil- $\beta$ -D-glucuronide (MUG), que vão sofrer a ação das enzimas presentes produzidas pelos coliformes. Para esta análise, foram utilizados 100 mL de cada amostra coletada. Uma seladora automaticamente distribui e sela a mistura da amostra com o reagente dentro das cavidades das cartelas (Figuras 4.1 e 4.2).

Os coliformes produzem a enzima  $\beta$ -galactosidase que degrada o ONPG, libertando o composto o-nitrofenol, demonstrado pelo aparecimento de uma coloração amarela, a qual indica a positividade do teste. A *E. coli* é a única entre os coliformes que sempre produz a enzima  $\beta$ -glicuronidase que hidrolisa o MUG, produzindo o 4-metilumbeliferona, um composto fluorescente que possui brilho azul quando iluminado por lâmpada UV.

Os números de coliformes totais e fecais são dados através da contagem de reação positiva nas cavidades das cartelas de incubação, onde os números de cavidades com reação positiva são analisados de acordo com a tabela de valores padronizados de concentração própria do kit. Os resultados são expressos por NMP (Número Mais Provável)/100 mL. O teste é padronizado e recomendado pelo Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA, 1998).



Figura 4.1 Cartelas Colilert® (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA) (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

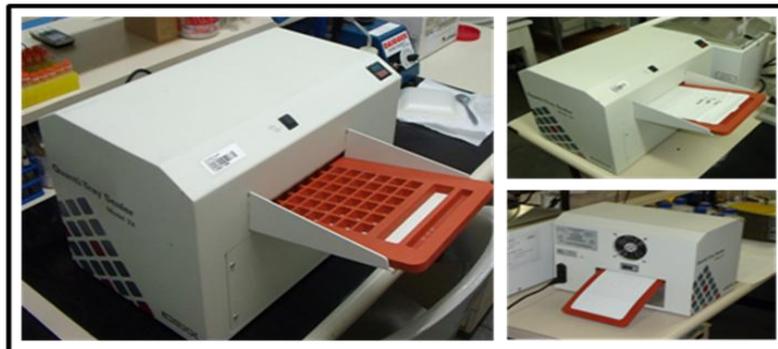


Figura 4.2 Seladora Colilert® (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA) (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

### 4.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS DO ESGOTO

As amostras de esgoto foram semeadas diretamente nos meios de cultura (100 µL), sendo também feitas diluições em solução salina (NaCl) (nas concentrações  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), e 10µL de cada diluição foram semeados nos meios de cultura (Figura 4.3). Os meios utilizados compreendem: Tergitol - 7 (Oxoid) com TTC (Cloreto de Trifeniltetrazólico a 0,05%), GSP (*Glutamate Starch Phenol Red Agar*) (Oxoid) e EMB (*Eosin Methylene Blue Agar*) (Oxoid). O Tergitol é um meio seletivo e diferencial para a detecção de coliformes em amostras de alimentos e água. A adição de TTC permite o reconhecimento e a identificação de *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes*. O meio de GSP é indicado para o isolamento de *Pseudomonas aeruginosa*. Assim como o Tergitol, o meio de EMB é adequado para a detecção e diferenciação de microrganismos do grupo coliforme e outras bactérias gram-negativas.

Depois de semeadas, as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24 horas para crescimento bacteriano e posterior contagem das colônias nas placas. Os resultados do crescimento de colônias foram expressos em UFCs (unidades formadoras de colônias) nos meios de cultura utilizados, correspondentes às amostras de esgoto dos diferentes estágios do sistema de tratamento de esgoto.

A seleção das colônias para o isolamento e a identificação foi baseada nas diferenças morfológicas apresentadas (Figura 4.4). Diferentes colônias, típicas de bactérias gram-negativas, foram selecionadas e submetidas aos meios de triagem: CV (Costa & Vernin), SIM (Ácido Sulfídrico/Indol/Motilidade) e Ágar Citrato. Após a semeadura nestes meios, incubou-se novamente e colocou-se na estufa a 35°C por mais 18 a 24 horas. A identificação das

amostras clínicas e do esgoto foi realizada através da utilização de provas bioquímicas convencionais (Figura 4.5) (MURRAY *et al.*, 2003).

As amostras identificadas foram preservadas em ágar estoque à temperatura ambiente e a  $-20^{\circ}\text{C}$  em meio de BHI acrescido de 20% de glicerol, para as futuras análises de resistência aos antimicrobianos.

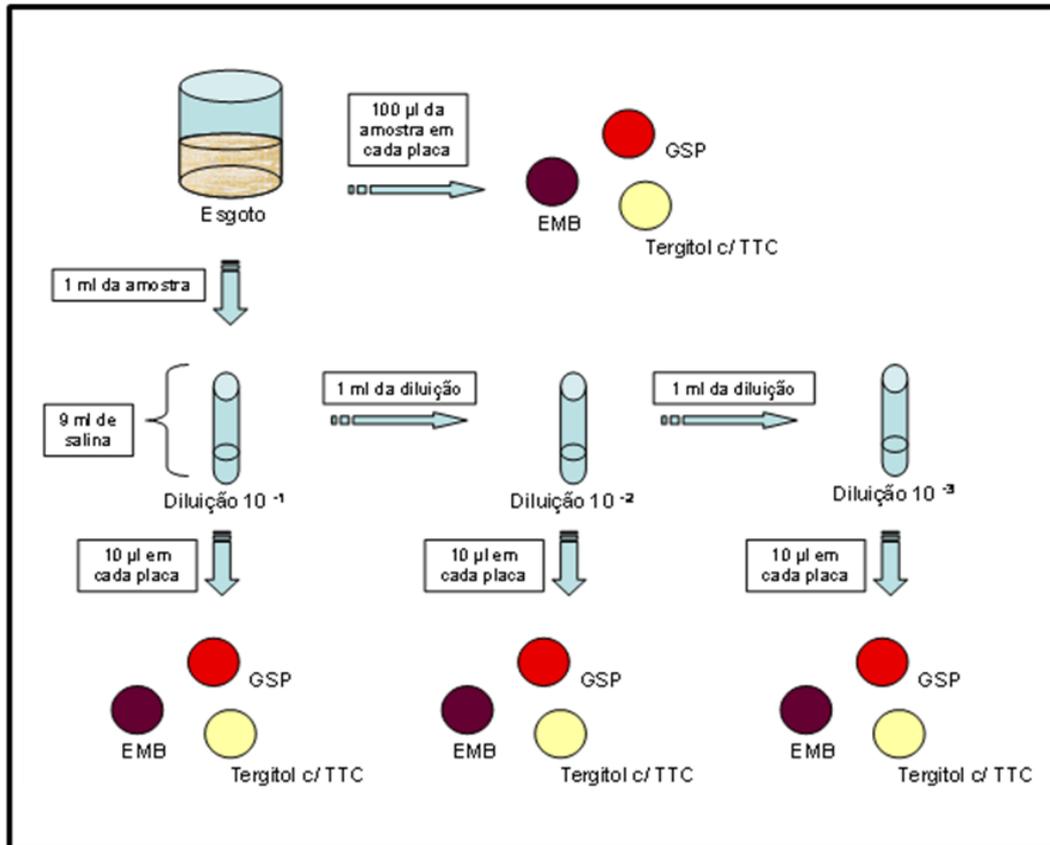


Figura 4.3 Esquema das diluições empregadas no trabalho

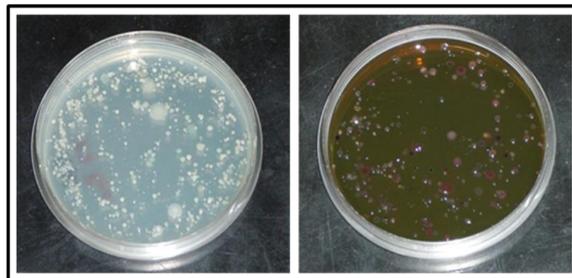


Figura 4.4 Bactérias isoladas após período de incubação (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

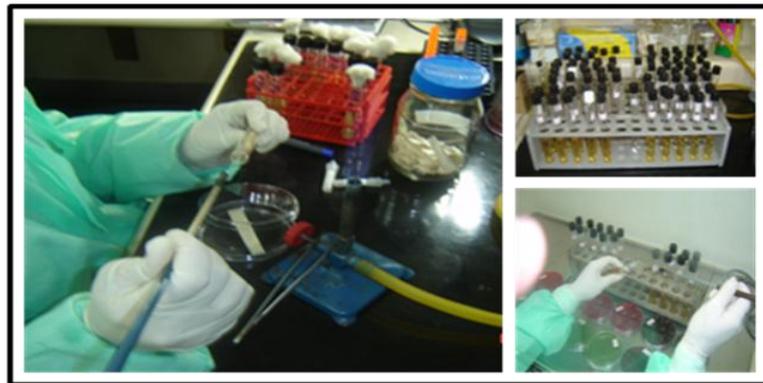


Figura 4.5. Etapa de identificação dos isolados bacterianos (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

#### 4.4 COLETA E PROCESSAMENTO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

Entre setembro de 2008 e março de 2009, 36 amostras de isolados clínicos foram recebidas do mesmo hospital, cuja estação de tratamento foi analisada. Estas amostras foram isoladas de diferentes pacientes e sítios: swab retal (n=22), secreção de cavidade abdominal (n=1), secreção retal (n=1), urina (n=1) e sítios não-determinados (n=11). As amostras foram recebidas em ágar estoque e foram re-identificadas conforme descrito, anteriormente, para os isolados do esgoto hospitalar. As amostras bacterianas de origem clínica foram processadas para estudos de genotipagem.

#### 4.5 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

A suscetibilidade dos micro-organismos isolados foi testada através do teste de difusão em ágar (disco-difusão), conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Para o teste de difusão em ágar, as colônias foram semeadas em ágar nutriente. A partir de tal meio, uma alçada das colônias foi transferida para uma solução salina e a suspensão foi comparada com o padrão de turvação 0,5 da escala de Mc Farland. Em seguida, foi realizada a semeadura no meio de ágar *Müller-Hinton* e os discos de antibióticos (Oxoid/Basingstoke, Hampshire, England) próprios para bactérias gram-negativas foram introduzidos no meio. Os antibióticos utilizados encontram-se listados na Tabela 4.1.

As placas foram colocadas na estufa a 35°C por 16 a 18 horas. O resultado do teste de difusão em ágar para a resistência aos antibióticos foi obtido através da medida do halo de inibição de crescimento provocado pelos discos de antibióticos colocados nas placas

semeadas (Figura 4.6). De acordo com o diâmetro do halo de inibição foi possível verificar se a bactéria era sensível, apresentava resistência intermediária ou era resistente aos antibióticos testados. Os diâmetros da zona de inibição são particulares para cada droga e microrganismo, sendo comparados com os diâmetros padronizados do CLSI (2009). Vale ressaltar que os resultados de resistência intermediária foram considerados resistentes para uma análise mais concisa neste presente trabalho.

Tabela 4.1 Antibióticos utilizados, concentração e classe a que pertencem

Antibióticos	Concentração (µg)
Amicacina (AMK)	30
Gentamicina (CN)	10
Ciprofloxacina (CIP)	5
Cefalotina (CEF)	30
Cefoxitina (FOX)	30
Cefotaxima (CTX)	30
Ceftazidima (CAZ)	30
Cefepime (FEP)	30
Imipenem (IPM)	10
Meropenem (MEM)	10
Ampicilina/sulbactam (SAM)	20
Piperacilina/tazobactam (TZP)	100/10
Sulfametoxazol/trimetoprim (SXT)	25
Aztreonam (ATM)	30
Polimixina B (PB)	300
Colistina (CT)	10
Minociclina (MH)	30
Levofloxacina (LEV)	5

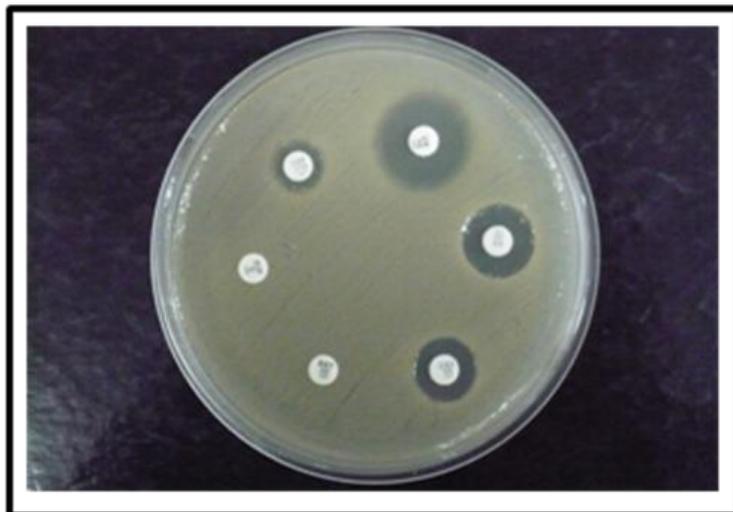


Figura 4.6 Antibiograma; método de difusão em ágar (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

#### 4.6 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBL

Para a detecção fenotípica da produção de ESBL foi empregado o teste de aproximação de discos (JARLIER *et al.*, 1988). No teste de aproximação de discos, o preparo da suspensão e o inóculo em placa de ágar *Müller-Hinton* são realizados da mesma maneira como no teste de suscetibilidade descrito anteriormente. No centro da placa foi colocado um disco contendo amoxicilina em conjunto com um inibidor de  $\beta$ -lactamases, o ácido clavulânico e, ao redor deste, foram colocados discos de antibióticos (aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e cefepime) a uma distância de 20 mm centro a centro.

As placas foram colocadas na estufa a 35°C, por 16 a 18 horas. Após a incubação, uma deformação no halo de inibição do  $\beta$ -lactâmico próximo ao disco contendo o ácido clavulânico é indicativa de um resultado positivo (Figura 4.7).

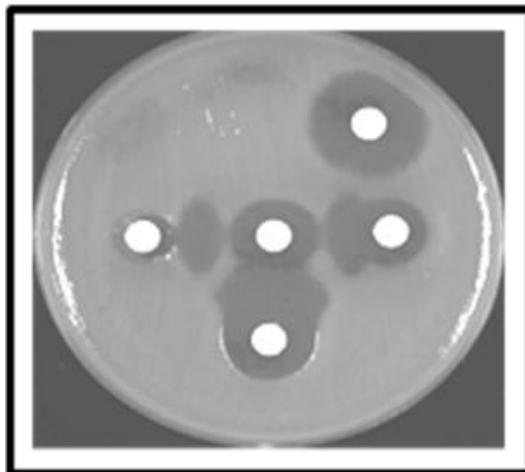


Figura 4.7 Detecção fenotípica positiva de ESBL (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

#### 4.7 DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES

Cepas bacterianas que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenemas, de acordo com as recomendações do CLSI (2009), no teste de difusão em ágar descrito anteriormente, foram submetidas ao teste de Hodge modificado, segundo Lee *et al.* (2001).

Uma suspensão bacteriana da cepa *Escherichia coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 foi preparada em solução salina até atingir a turvação equivalente à escala 0.5 de Mc Farland. A suspensão foi inoculada em placa contendo ágar *Müller-Hinton*. Em seguida, um disco de ertapenem (10µg – Oxoid) foi adicionado ao centro da placa e, a partir da borda do disco de antibiótico, a cepa teste foi estriada em direção à borda da placa (Figura 4.8).

As placas foram incubadas a 35°C, por 16 a 18 horas. Quando o crescimento da cepa *E. coli* no interior do halo de inibição do ertapenem formou uma zona distorcida, interpretou-se o resultado como positivo, ou seja, havia produção de carbapenemase do tipo KPC. Quando o halo de inibição do ertapenem permaneceu inalterado, o resultado foi considerado negativo (Figura 4.8).

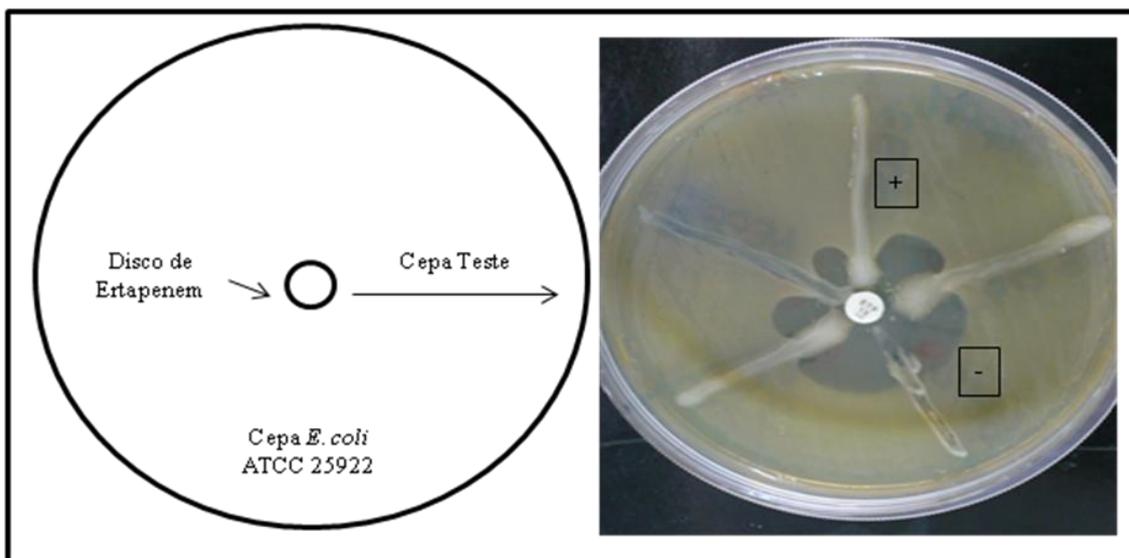


Figura 4.8 Esquema de realização do teste de Hodge modificado (Fonte: Arquivos do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC/FIOCRUZ)

#### 4.8 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA foi realizada pelo método de fervura. Uma colônia de cada amostra, fenotipicamente, caracterizada como produtora de ESBL e/ou carbapenemase do tipo KPC, proveniente de cultura recente em ágar nutriente, foi suspensa em 500  $\mu$ L de água destilada esterilizada. As células foram lisadas por aquecimento a 95°C por 10 minutos e, em seguida, resfriadas em gelo durante 5 minutos. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 13.000 rpm. Um volume de 1  $\mu$ L do total do sobrenadante foi utilizado em cada reação de PCR.

#### 4.9 DETECÇÃO DOS DETERMINANTES GENÉTICOS DE RESISTÊNCIA

Foram realizadas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a detecção das seguintes sequências gênicas: *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>KPC</sub>. As sequências dos iniciadores (“primers”) utilizados para a amplificação dos genes e suas respectivas referências estão apresentadas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 Iniciadores utilizados nas reações de PCR

$\beta$ -lactamases	Genes	Sequências dos iniciadores	Tamanho dos produtos (pb)	Referências
TEM	<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	5'GCGGAACCCCTATTTG 3' 5'ACCAATGCTTAATCAGTGAG 3'	860	Hasman <i>et al.</i> , 2005
SHV	<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	5'TTATCTCCCTGTTAGCCACC 3' 5'GATTTGCTGATTTTCGCTCGG 3'	797	Hasman <i>et al.</i> , 2005
CTX-M	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	5'ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC 3' 5'TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG 3'	593	Mulvey <i>et al.</i> , 2003
KPC	<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	5' TGTCACTGTATCGCCGTC 3' 5' CTCAGTGCTCTACAGAAAAACC 3'	1011	Ygiti <i>et al.</i> , 2001

#### 4.9.1 Detecção de *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>

A reação de PCR foi realizada em um volume final de 25  $\mu$ L. As reações individuais foram compostas de água esterilizada, tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 25 pmoles de cada iniciador, 2,5 U da enzima Taq polimerase e 1  $\mu$ L do DNA obtido pela extração por fervura. O DNA foi, inicialmente, desnaturado por aquecimento a 94°C por 3 minutos. Em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos térmicos: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 50°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

#### 4.9.2 Detecção de *bla*<sub>KPC</sub>

Para a amplificação de *bla*<sub>KPC</sub>, a reação da PCR também foi realizada em um volume final de 25  $\mu$ L. As reações individuais foram compostas de água esterilizada, tampão de reação 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP, 25 pmoles de cada iniciador, 1,25 U da enzima Taq polimerase e 1  $\mu$ L do DNA obtido pela extração por fervura. O DNA foi, inicialmente, desnaturado por aquecimento a 94°C por 3 minutos. Em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos térmicos: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 51°C para

anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

#### 4.9.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Os produtos amplificados por PCR foram analisados em gel de agarose. Os géis foram preparados dissolvendo a agarose em tampão TBE 0,5X de modo a obter uma concentração de 1,5 %. Foram aplicados 7 µL do produto da PCR e, a estes, foi adicionado 1 µL de solução azul de bromofenol. O marcador de peso molecular 100pb DNA *Ladder* (GIBCO BRL Life Technologies) foi aplicado ao gel de agarose para a determinação do tamanho dos fragmentos obtidos. A eletroforese foi realizada em tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 90 volts. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e registrados utilizando ferramenta de fotodocumentação.

### 4.10 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO DNA GENÔMICO

Com o objetivo de rastrear possíveis similaridades genéticas entre isolados do esgoto e isolados clínicos, através da eletroforese em gel de campo pulsado (*Pulsed-Field Gel Electrophoresis* – PFGE), foram selecionadas amostras coletadas no mesmo período. Seguindo este critério, 14 isolados de *K. pneumoniae* oriundas do esgoto e 15 isolados desta espécie provenientes de amostras clínicas (pacientes) foram processados, totalizando 29 amostras. A eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é reconhecidamente uma importante ferramenta para análise do genoma bacteriano e para o estudo da diversidade entre cepas de uma mesma espécie (SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

Os isolados foram semeados em tubos com ágar nutriente e incubados a 37°C por 24 horas para crescimento bacteriano. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana, adicionando 1 mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 3 da escala de Mac Farland. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos para um tubo *ependorf* contendo 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL). Foram adicionados à suspensão de células 200 µL de agarose 1% (0,1 g de agarose *low melting*, 0,5 mL de SDS 1%, 9,4 mL de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 MM pH 8,0]). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (plugs), os mesmos foram transferidos para tubos contendo 2 mL de solução

de lise (NaCl 1M, TRIS-HCl 6 mM pH 7.6, EDTA 100mM pH 8.0, BRIJ-58 0,5%, desoxicolato 0,2%, sarcosina 0,5%, lisozima 1 mg/mL) e 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL) e incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com 10 mL de água esterilizada a 50°C por 15 minutos e uma vez com 7mL de Tampão TE a 50°C por 15 minutos.

Os blocos foram transferidos para um tubo *ependorf* contendo solução tampão da enzima *XbaI* (90 µL de água esterilizada e 10 µL de solução tampão da enzima) e incubadas a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, os plugs foram tratados com a enzima de restrição *XbaI* (40U) (Roche) por 3 horas a 36°C. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1%, preparado em TBE 0,4X (TRIS 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM pH 8.3), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 15 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C. Foram utilizados padrões de peso molecular Lambda DNA *Leader Pulse* (50-1000 Kb - Sigma) nas corridas.

Após as corridas, os géis foram corados com brometo de etídio, visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se ferramenta de fotodocumentação Image Master VDS (Pharmacia Biotech). As análises dos géis e a confecção dos dendrogramas foram realizadas com auxílio do *software GelCompar II* (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*.

#### 4.11 ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos nos experimentos e testes realizados no trabalho foram processados e analisados com auxílio do *software Epi Info* versão 3.5.1. (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA) e *Microsoft Office Excel 2007* (Microsoft®).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DE COLIFORMES TOTAIS E FECAIS

Os resultados dos coliformes foram expressos, de acordo com a tabela fornecida pelo fabricante, em NMP/100mL. Nas figuras a seguir, estão apresentados os resultados da determinação da concentração de coliformes totais e fecais (termotolerantes) encontrados nos efluentes hospitalares (Figuras 5.1 e 5.2).

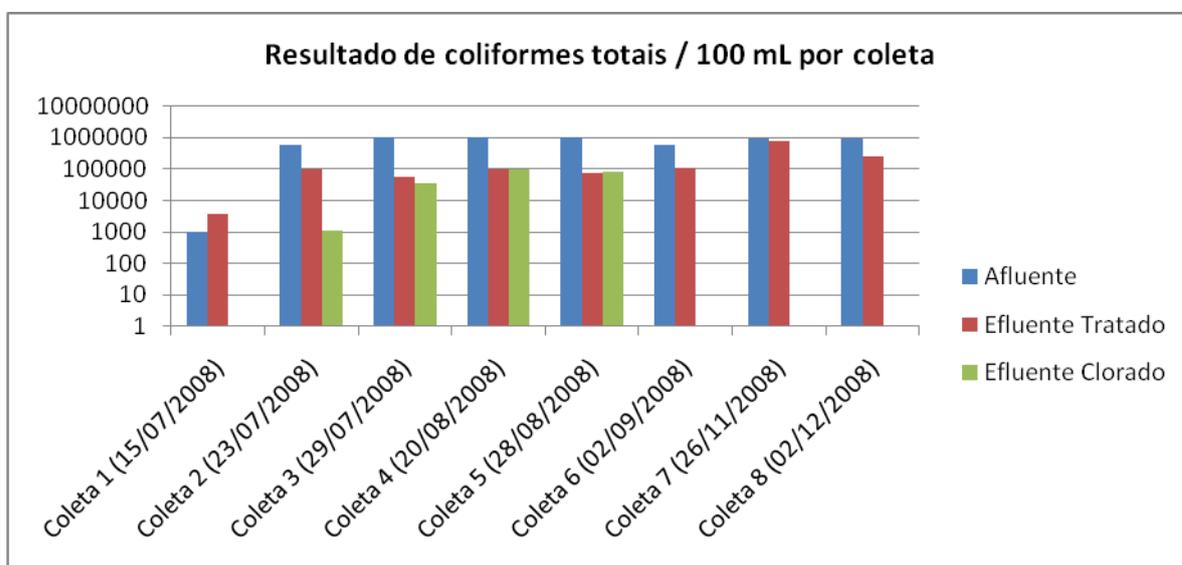


Figura 5.1 Número mais provável (NMP) de coliformes totais por 100 mL de amostra nas respectivas coletas

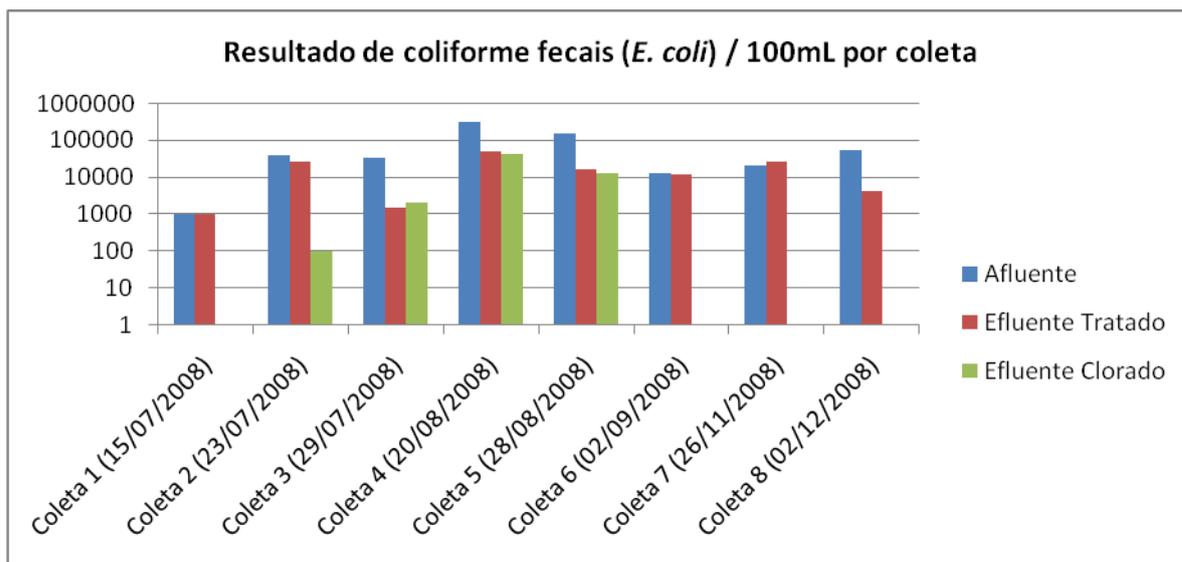


Figura 5.2 Número mais provável (NMP) de coliformes fecais por 100 mL de amostra nas respectivas coletas

As médias destes resultados, relacionados com a eficiência da estação de tratamento de esgoto, encontram-se na tabela a seguir (Tabela 4.1).

Tabela 5.1 Médias das contagens de coliformes totais e fecais em diferentes estágios da estação de tratamento

Parâmetros	Afluente	Efluente Tratado	Efluente Clorado
Coliformes Totais (NMP/100mL)	$7,4 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$0,3 \times 10^5$
Coliformes Fecais (NMP/100mL)	$0,8 \times 10^5$	$0,2 \times 10^5$	$0,07 \times 10^5$

## 5.2 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DAS BACTÉRIAS

Com relação à contagem de colônias, a média dos resultados obtidos no afluente, no efluente tratado e no efluente clorado foram:  $0,52 \times 10^3$  UFC/100mL,  $0,47 \times 10^3$  UFC/100mL e  $0,16 \times 10^3$  UFC/100mL, respectivamente. A melhor diluição para o crescimento e o isolamento de bactérias nos meios utilizados foi  $10^{-2}$ . Nas diluições superiores a  $10^{-2}$ , o número de colônias chegou a ser superior a 200, ficando estas muito próximas umas das outras e sobrepostas, comprometendo assim o isolamento e a identificação.

O resultado da contagem total média de colônias nos meios de cultura utilizados, ao longo do estudo, está esquematizado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 Médias das contagens de unidades formadoras de colônias (UFC) nos diferentes meios de cultura por ponto de coleta

<b>Meios de Cultura</b>	<b>Afluente</b>	<b>Efluente Tratado</b>	<b>Efluente Clorado</b>
Tergitol puro	147	146	49
Tergitol 10 <sup>-1</sup>	89	67	18
Tergitol 10 <sup>-2</sup>	7	10	2
Tergitol 10 <sup>-3</sup>	2	1	1
G S P puro	156	143	59
G S P 10 <sup>-1</sup>	130	116	34
G S P 10 <sup>-2</sup>	45	53	8
G S P 10 <sup>-3</sup>	12	5	1
E M B puro	146	145	56
E M B 10 <sup>-1</sup>	97	80	22
E M B 10 <sup>-2</sup>	19	11	3
E M B 10 <sup>-3</sup>	1	1	1

Foram selecionadas e identificadas 226 bactérias gram-negativas de acordo com as características morfológicas das colônias crescidas nas placas com meio de cultura. A distribuição do número de colônias identificadas entre os pontos de coleta encontram-se na Tabela 5.3

Tabela 5.3 Distribuição do número de colônias identificadas por pontos de coleta

<b>Pontos de coleta</b>	<b>Nº de isolados identificados (%)</b>
Afluente	109 (48)
Efluente Tratado	81 (36)
Efluente Clorado	36 (16)
Total	226

Entre todos os isolados identificados (n=226), bactérias da família *Enterobacteriaceae* foram mais frequentes com 213 (94,3%) isolados identificados, enquanto outras espécies não-enterobactérias corresponderam a 5,7% (n=13). Entre as *Enterobacteriaceae*, as espécies mais frequentes foram: *K. pneumoniae* (40%), seguida de *E. coli* (15,5%) e *Enterobacter cloacae*

(14,2%), ambas isoladas em todas as coletas. Outras espécies de enterobactérias identificadas foram: *Citrobacter freundii* (2,2%), *Enterobacter asburiae* (1,3%), *Escherichia hermannii* (0,4%), *Routella ornithinolytica* (0,4%), *Klebsiella oxytoca* (4%), *Routella terrigena* (0,9%), *Pantoea agglomerans* (11,5%), *Proteus mirabilis* (0,4%), *Serratia rubidaceae* (0,4%), *Serratia marcescens* (0,4%). Muitos tipos de micro-organismos que são característicos dos esgotos tais como *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa*, quando não encontrados, foram pouco identificados. Entre outras não-enterobactérias encontram-se: *Aeromonas* spp. (2,2%), *Pseudomonas aeruginosa* (0,9%) e *Chromobacterium violaceum* (1,3%). A distribuição das bactérias identificadas nos efluentes hospitalares está demonstrada na Tabela 5.4. É importante ressaltar que os meios utilizados selecionavam bactérias gram-negativas e, portanto, já era esperado não isolar espécies de bactérias gram-positivas, típicas de esgotos.

Os resultados apontam que o afluente hospitalar possuiu uma maior variedade de espécies de bactérias quando comparado aos demais efluentes, enquanto que o efluente clorado apresentou uma menor variedade. Ainda assim, microorganismos como *K. pneumoniae* foram detectados na saída final do efluente clorado, indicando alguma persistência destes e outros coliformes no produto final do sistema de tratamento empregado.

Tabela 5.4 Bactérias identificadas nas amostras do sistema de tratamento de esgoto

Bactérias isoladas e identificadas	Grupo	Nº. de isolados no afluente (%)	Nº. de isolados no efluente tratado (%)	Nº. de isolados no efluente clorado (%)	Total (%)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	NE	1 (0,9)	1 (1,2)	0 (0)	2 (0,9)
<i>Aeromonas</i> spp.	NE	3 (2,7)	2 (2,5)	0 (0)	5 (2,2)
<i>Citrobacter freundii</i>	E	4 (3,7)	1 (1,2)	0 (0)	5 (2,2)
<i>Chromobacterium violaceum</i>	NE	0 (0)	3 (3,7)	0 (0)	3 (1,3)
<i>Enterobacter asburiae</i>	E	0 (0)	0 (0)	3 (8,3)	3 (1,3)
<i>Enterobacter cloacae</i>	E	15 (13,8)	16 (19,8)	1 (2,8)	32 (14,2)
<i>Enterobacter</i> spp.	E	0 (0)	4 (4,9)	2 (5,5)	6 (2,7)
<i>Escherichia coli</i>	E	24 (22,1)	8 (9,9)	3 (8,3)	35 (15,5)
<i>Escherichia hermannii</i>	E	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	E	4 (3,7)	3 (3,7)	2 (5,5)	9 (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	E	41 (37,6)	31 (38,3)	18 (50)	90 (40)
<i>Pantoea agglomerans</i>	E	10 (9,2)	10 (12,4)	6 (16,7)	26 (11,5)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NE	1 (0,9)	1 (1,2)	0 (0)	2 (0,9)
<i>Proteus mirabilis</i>	E	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
<i>Routella ornithinolytica</i>	E	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
<i>Routella terrigena</i>	E	0 (0)	1 (1,2)	1 (2,8)	2 (0,9)
<i>Serratia marcescens</i>	E	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
<i>Serratia rubidaceae</i>	E	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	NE	1 (0,9)	0 (0)	0 (0)	1 (0,4)
Total	-	109	81	36	226

E- *Enterobacteriaceae*; NE-Não-enterobactérias

Quanto aos isolados clínicos, 36 cepas foram recebidas no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, das quais 30 foram identificadas. Não foi possível a identificação de seis isolados, pois os mesmos não apresentaram crescimento nas provas de identificação. Entre os 30 isolados, foram identificadas as seguintes espécies de gram-negativos: *P. aeruginosa* (n=1), *Enterobacter cloacae* (n=2), *E. coli* (n=6), *K. pneumoniae* (n=21). Os isolados clínicos coletados no mesmo período que as amostras do esgoto foram selecionados para a PFGE.

### 5.3 TESTE DE SUSCETIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O estudo da susceptibilidade bacteriana aos diferentes antibióticos é fundamental devido à alta incidência de infecção hospitalar além da disseminação e do aumento da frequência de identificação de bactérias resistentes e seus genes de resistência. Foram testadas 226 bactérias, sendo 213 enterobactérias e 13 não-enterobactérias, seguindo as recomendações do CLSI para os diferentes grupos bacterianos.

Para as enterobactérias, foram testados 11 antimicrobianos: amicacina, ciprofloxacina, sulfametoxazol-trimetoprim, piperacilina-tazobactam, cefalotina, cefoxitina, ceftazidima, cefotaxima, cefepime, imipenem e meropenem. Cefalotina, cefotaxima e sulfametoxazol-trimetoprim foram os antimicrobianos para os quais foram encontradas as maiores taxas de resistência. Os resultados referentes à frequência de enterobactérias resistentes aos antibióticos testados encontram-se sumarizados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 Percentual de resistência entre enterobactérias para cada antimicrobiano de acordo com o ponto de coleta

<b>Antibióticos</b>	<b>Afluyente nº/total (%)</b>	<b>Efluente tratado nº/total (%)</b>	<b>Efluente clorado nº/total (%)</b>	<b>Total</b>
AMK	26/103 (25,2)	18/74 (24,3)	15/36 (41,7)	59/213 (27,7)
CIP	17/103 (16,5)	21/74 (28,3)	8/36 (22,2)	46/213 (21,6)
SXT	34/103 (33)	29/74 (39,2)	15/36 (41,7)	78/213 (36,6)
TZP	16/103 (15,5)	14/74 (19)	8/36 (22,2)	38/213 (17,8)
CEF	72/103 (69,9)	61/74 (82,4)	30/36 (83,3)	163/213 (76,5)
FOX	28/103 (27,1)	29/74 (39,2)	18/36 (50)	75/213 (35,2)
CAZ	8/103 (7,8)	12/74 (16,2)	10/36 (27,8)	30/213 (14,1)
CTX	46/103 (44,7)	36/74 (48,6)	20/36 (55,5)	102/213 (47,9)
FEP	9/103 (8,7)	8/74 (11)	3/36 (8,3)	20/213 (9,4)
IPM	1/103 (1)	0/74 (0)	0/36 (0)	1/213 (0,5)
MEM	3/103 (3)	1/74 (1,3)	1/36 (2,8)	5/213 (2,3)

AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TZP, piperacilina-tazobactam; CEF, cefalotina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

No caso de *K. pneumoniae*, principal espécie identificada entre as bactérias isoladas, os perfis de resistência encontram-se representadas na Figura 5.3.

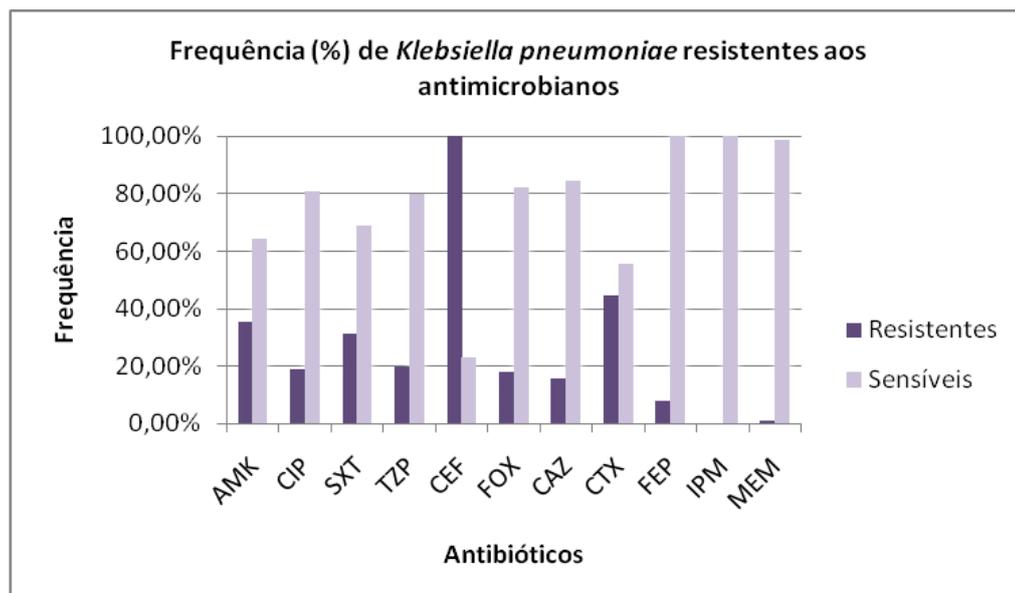


Figura 5.3 Perfil (frequência) de resistência aos antimicrobianos entre *K. pneumoniae* isoladas em todos os pontos de coleta da ETE. AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TZP, piperacilina-tazobactam; CEF, cefalotina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

No caso dos isolados identificados como *Chromobacterium violaceum* e *Aeromonas* spp., os antibióticos testados foram os mesmos utilizados para as enterobactérias. Os três isolados de *Chromobacterium violaceum* apresentaram o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos: resistência à cefalotina, à cefoxitina, à ceftazidima e à cefotaxima, e sensibilidade à amicacina, à ciprofloxacina, ao sulfametoxazol-trimetoprim, à piperacilina-tazobactam, ao cefepime, ao imipenem e ao meropenem. Todos os isolados de *Aeromonas* spp. apresentaram resistência à cefalotina; e suscetibilidade à piperacilina-tazobactam, ao meropenem, ao imipenem e ao cefepime (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 Perfil de *Aeromonas* spp. (n=5) resistentes aos antibióticos testados

Perfil	Antibióticos										
	AMK	CIP	SXT	TZP	CEF	FOX	CAZ	CTX	FEP	IPM	MEM
Nº Sensíveis	3	4	3	5	0	3	4	4	5	5	5
Nº Resistentes	2	1	2	0	5	2	1	1	0	0	0

AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TZP, piperacilina-tazobactam; CEF, cefalotina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

Os dois isolados identificados como *Acinetobacter baumannii* foram testados quanto à sensibilidade a 13 antibióticos e apresentaram o mesmo perfil: resistência à amicacina, à

ciprofloxacina, à piperacilina-tazobactam, à cefalotina, à ceftazidima e à cefotaxima; sensibilidade à gentamicina, ao sulfametoxazol-trimetoprim, ao cefepime, ao imipenem, ao meropenem, à colistina e à polimixina B. No caso do único isolado identificado como *Stenotrophomonas maltophilia*, foi observada sensibilidade aos 4 antimicrobianos testados: minociclina, sulfametoxazol-trimetoprim, levofloxacina e polimixina B. Quanto à suscetibilidade aos antimicrobianos, o mesmo perfil foi encontrado para os dois isolados de *P. aeruginosa*: resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim e à ampicilina-sulbactam; e sensibilidade à amicacina, à gentamicina, à ciprofloxacina, à piperacilina-tazobactam, à ceftazidima, ao cefepime, ao meropenem, à colistina e à polimixina B. Considerando todos os resultados, no efluente clorado, ainda foi possível identificar maiores taxas de resistência quando comparadas àquelas observadas nos demais pontos, para os seguintes antibióticos: amicacina, sulfametoxazol-trimetoprim, cefoxitina, cefotaxima e ceftazidima.

As bactérias de origem clínica também foram testadas quanto à sensibilidade e resistência aos diferentes grupos de antimicrobianos. Os resultados obtidos entre as enterobactérias identificadas encontram-se representados Figura 5.4. No caso do único isolado de *P. aeruginosa* recebida do hospital, o mesmo apresentou sensibilidade à amicacina, à piperacilina-tazobactam, ao cefepime, à ceftazidima, à colistina, à polimixina B e ao aztreonam, e resistência aos seguintes antimicrobianos: sulfametoxazol-trimetoprim, meropenem, ciprofloxacina, imipenem, gentamicina e ampicilina-sulbactam. A resistência aos carbapenêmicos (meropenem, imipenem) sugere outros mecanismos de resistência, os quais não são alvos deste trabalho. Em razão do número reduzido de isolados clínicos, os padrões de resistência destes não foram comparados com os padrões de resistência dos isolados provenientes do esgoto.

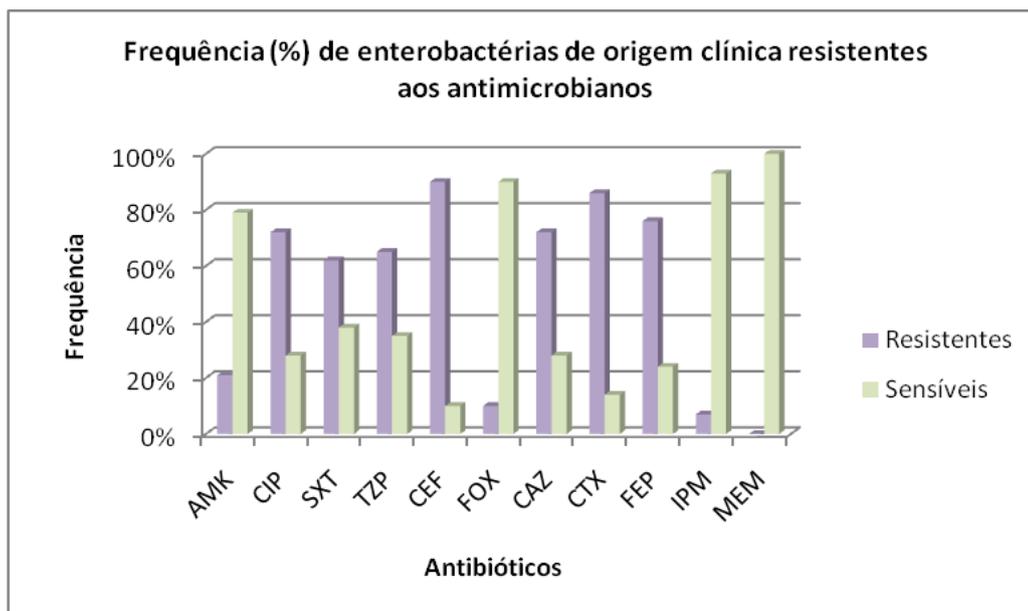


Figura 5.4 Perfil (frequência) de resistência aos antimicrobianos entre enterobactérias de origem clínica coletadas para análise do PFGE. AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TZP, piperacilina-tazobactam; CEF, cefalotina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

#### 5.4 DETECÇÃO DE ESBL E CARBAPENEMASES TIPO KPC

Através dos testes fenotípicos empregados, um número relevante do total de bactérias identificadas foi diagnosticado como produtores de enzimas  $\beta$ -lactamases de amplo espectro (ESBL), correspondendo a 43% do total. A frequência de produtores de ESBL, ao longo dos pontos de coleta, pode ser vista na Tabela 5.7. Nas amostras de efluente clorado, observou-se a maior frequência de detecção de produtores de ESBL.

Tabela 5.7 Frequência e distribuição dos isolados produtores e não-produtores de ESBL nos pontos de coleta

Amostras	ESBL-positivos	ESBL-negativos	Total
	nº/total (%)	nº/total (%)	
Afluente	41/109 (38)	68/109 (62)	109
Efluente Tratado	36/81 (44)	45/81 (56)	81
Efluente Clorado	20/36 (56)	16/36 (44)	36
Total	97/226 (43)	129/226 (57)	226

Entre os isolados identificados como produtores de ESBL, 96 eram enterobactérias e apenas um foi caracterizado como *Aeromonas* spp. A frequência de identificação das espécies produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido está expressa na figura a seguir (Figura 5.5).

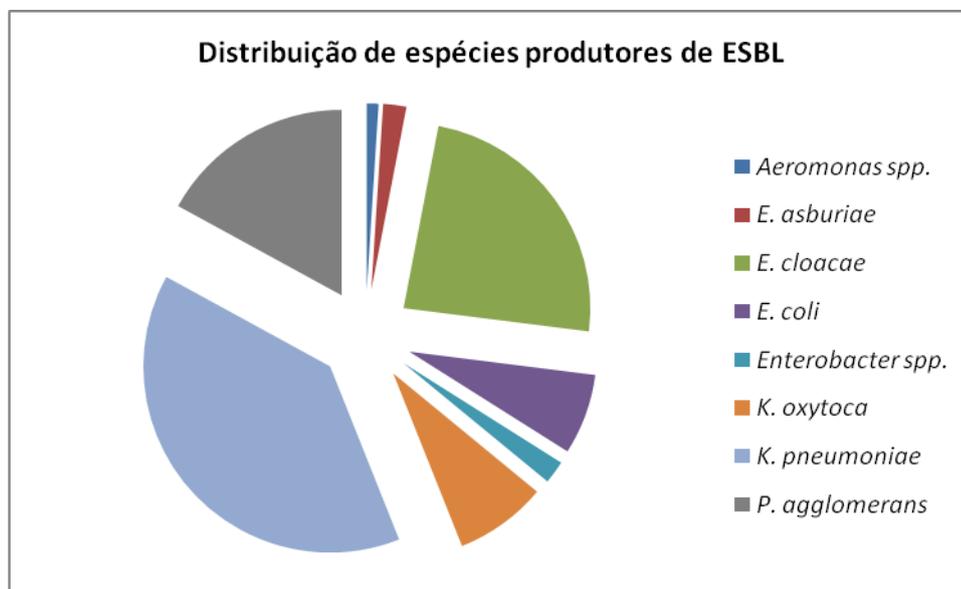


Figura 5.5 Espécies identificadas como produtoras de ESBL.

Entre os micro-organismos ESBL positivos, as maiores taxas de resistência foram observadas para a cefalotina (uma cefalosporina de 1ª geração) e a cefotaxima (uma cefalosporina de 3ª geração). A co-resistência, neste grupo de micro-organismos, foi observada em: amicacina (43%), ciprofloxacina (33%) e sulfametoxazol-trimetoprim (60%). Os perfis de resistência entre os isolados produtores de ESBL estão representados na Figura 5.6. Todos estes isolados foram considerados multirresistentes, apresentando resistência a dois ou mais antimicrobianos.

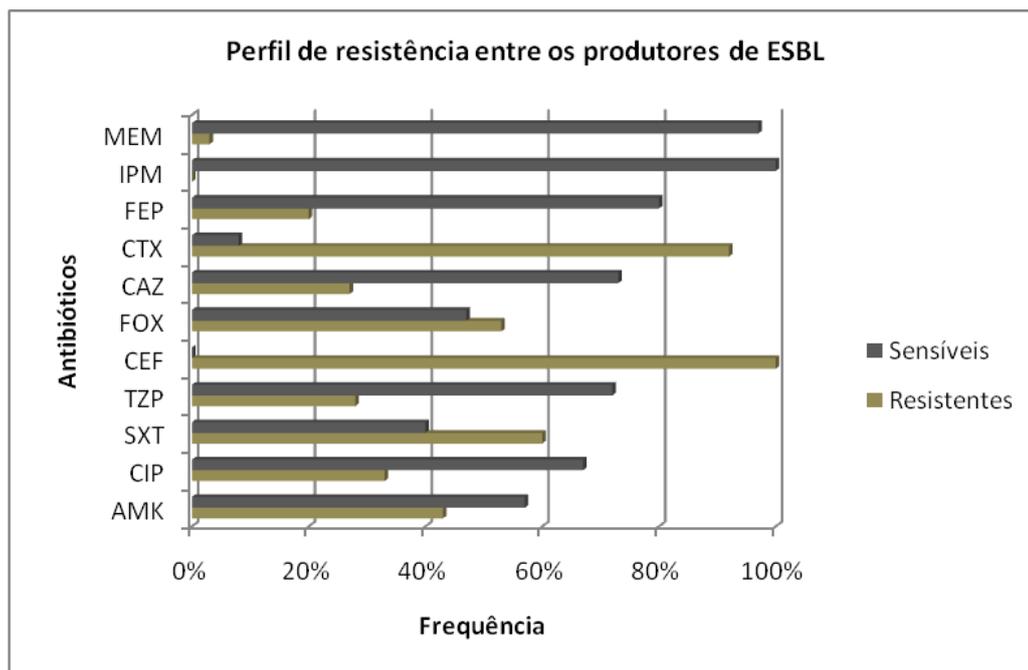


Figura 5.6 Perfil (frequência) de resistência aos antimicrobianos entre os micro-organismos produtores de ESBL isolados dos efluentes hospitalares. AMK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim; TZP, piperacilina-tazobactam; CEF, cefalotina; FOX, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; IPM, imipenem; MEM, meropenem.

Quanto aos 30 isolados de origem clínica identificados, 25 (83%) foram caracterizados, fenotipicamente, como produtores de enzimas ESBL, sendo 17 *K. pneumoniae*, 6 *E. coli* e 2 *E. cloacae*. As taxas de resistência e co-resistência deste grupo compreendem: 24% para amicacina, 80% para ciprofloxacina, 72% para sulfametoxazol-trimetoprim, 68% para piperacilina-tazobactam, 100% para cefalotina, 12% para cefoxitina, 84% para ceftazidima, 100% para cefotaxima, 88% para cefepime, 8% para imipenem e 0% para meropenem.

A resistência a pelo menos um carbapenema testado (imipenem e/ou meropenem) foi detectada em 5 isolados de enterobactérias. A sensibilidade reduzida a este grupo de antibióticos, seguindo recomendações do CLSI, foi detectada em 13 isolados também de enterobactérias. Estas 18 enterobactérias foram submetidas ao teste de Hodge modificado para investigar a produção fenotípica de carbapenemase do tipo KPC e apenas três apresentaram resultado positivo (dois isolados de *K. pneumoniae* e um isolado *P. agglomerans*). Os dois isolados de *K. pneumoniae* também foram caracterizados, fenotipicamente, como produtores de ESBL. Com relação aos isolados clínicos, duas amostras (*K. pneumoniae*) apresentaram resistência ao imipenem, mas em apenas uma foi confirmada a produção de carbapenemase pelo teste de Hodge modificado. Dois isolados (um de *K. pneumoniae* e um de *E. coli*)

apresentaram sensibilidade reduzida a pelo menos um carbapenema testado e foram positivos para o teste fenotípico de carbapenemase KPC empregado.

Todos os 97 isolados identificados, através de testes fenotípicos, como produtores de beta-lactamases de amplo espectro foram selecionados para a caracterização molecular dos determinantes genéticos dos principais tipos destas enzimas (TEM, SHV e CTX-M) pela PCR. Os produtos amplificados correspondentes aos determinantes genéticos *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foram detectados em 67% (n=65), 82% (n=80) e 48% (n=47) dos isolados, respectivamente. Os resultados da caracterização molecular de ESBL encontram-se nas Tabelas 5.8 e 5.9:

Tabela 5.8 Frequência dos determinantes genéticos *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> entre os produtores de ESBL por ponto de coleta

<b>ESBL-positivos por ponto de coleta</b>	<b><i>bla</i><sub>CTX-M</sub> n (%)</b>	<b><i>bla</i><sub>TEM</sub> n (%)</b>	<b><i>bla</i><sub>SHV</sub> n (%)</b>
Afluente (n=41)	28 (68)	34 (83)	20 (49)
Efluente Tratado (n=36)	23 (64)	30 (83)	18 (50)
Efluente Clorado (n=20)	14 (70)	16 (80)	9 (45)
Total (n=97)	65 (67)	80 (82)	47 (48)

Tabela 5.9 Frequência dos determinantes genéticos *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> entre as espécie produtoras de ESBL

<b>Espécies</b>	<b><i>bla</i><sub>CTX-M</sub> nº/total (%)</b>	<b><i>bla</i><sub>TEM</sub> nº/total (%)</b>	<b><i>bla</i><sub>SHV</sub> nº/total (%)</b>
<i>Aeromonas</i> spp.	0 (0)	1/1 (100)	0 (0)
<i>E. asburiae</i>	1/2 (50)	2/2 (100)	1/2 (50)
<i>E. cloacae</i>	20/23 (87)	22/23 (96)	7/23 (30)
<i>Enterobacter</i> spp.	2/2 (100)	2/2 (100)	1/2 (50)
<i>E. coli</i>	4/7 (57)	7/7 (100)	4/7 (57)
<i>K. oxytoca</i>	7/8 (88)	7/8 (88)	1/8 (13)
<i>K. pneumoniae</i>	17/38 (45)	26/38 (69)	27/38 (71)
<i>P. agglomerans</i>	14/16 (88)	13/16 (81)	6/16 (38)
Total	65/97 (67)	80/97 (82)	47/97 (48)

A caracterização de dois ou mais genes codificadores de  $\beta$ -lactamases de amplo espectro, em um mesmo isolado, foi comum em grande parte das amostras (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 Frequência dos perfis de detecção dos determinantes genéticos

<b>Genes <math>\beta</math>-lactamases genes</b>	<b>nº de isolados (%)</b>
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	7 (7)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	35 (36)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>TEM</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	22 (23)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	1 (1)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	8 (8)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	15 (16)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	9 (9)
<b>Total</b>	<b>97</b>

Em dois isolados fenotipicamente caracterizados como produtores de KPC foi detectado o determinante *bla*<sub>KPC</sub>. Ambos os isolados eram *K. pneumoniae*, sendo um isolado obtido a partir do efluente tratado e outro no efluente clorado. Os isolados produtores de carbapenemases do tipo KPC também acumularam genes de resistência a outras beta-lactamases. Os resultados referentes aos produtores de KPC isolados do efluente hospitalar estão expressos na Tabela 5.11.

Tabela 5.11 *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas nos efluentes hospitalares

<b>Espécie bacteriana</b>	<b>Local de isolamento</b>	<b><math>\beta</math>-lactamases</b>
<i>K. pneumoniae</i>	Efluente Tratado	KPC; TEM; SHV
<i>K. pneumoniae</i>	Efluente Clorado	KPC; CTX-M; SHV; TEM

A Figura abaixo (Figura 5.7) demonstra um gel representativo dos fragmentos amplificados pela PCR e seu respectivos tamanhos (pb):

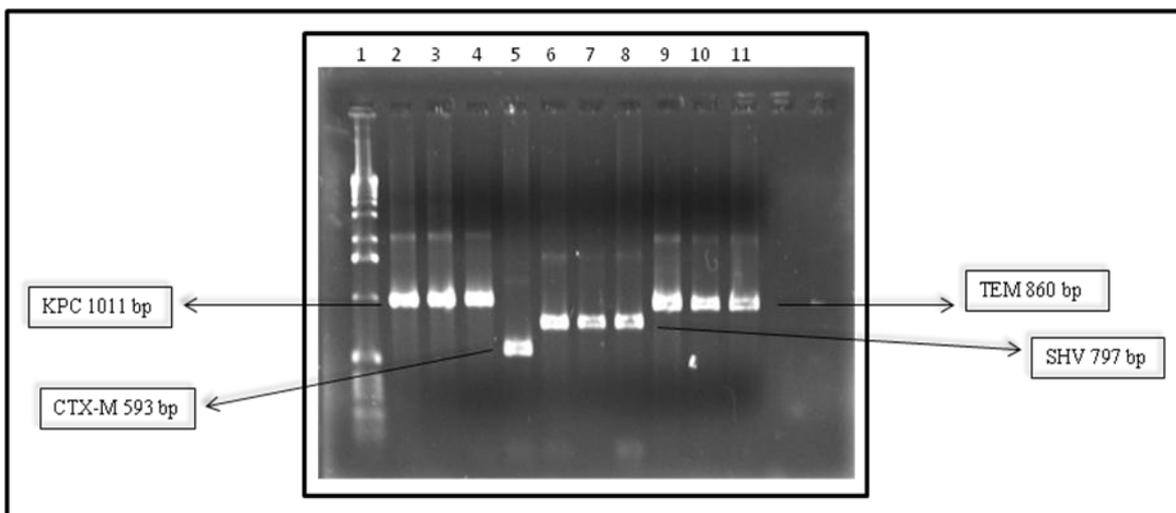


Figura 5.7 Gel representativo dos produtos da amplificação por PCR de amostras de *K. pneumoniae* isoladas dos efluentes hospitalares. 1- Padrão de peso molecular; 2- 160 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>KPC</sub>); 3- 232 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>KPC</sub>); 4- 252 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>KPC</sub>); 5- 160 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>CTX-M</sub>); 6- 160 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>SHV</sub>); 7- 232 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>SHV</sub>); 8- 252 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>SHV</sub>); 9- 160 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>TEM</sub>); 10- 232 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>TEM</sub>); 11- 252 *K. pneumoniae* (*bla*<sub>TEM</sub>).

Os isolados clínicos (n=25), cuja produção de ESBL foi detectada fenotipicamente, também foram submetidos à análise dos determinantes genéticos de resistência através da PCR. Os genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foram detectados em 84% (n=21), 80% (n=20) e 80% (n=20) dos isolados, respectivamente. Quanto ao gene *bla*<sub>KPC</sub>, este foi caracterizado nos 3 isolados (2 isolados de *K. pneumoniae* e um de *E. coli*) positivos para o teste de Hodge modificado.

## 5.5 ANÁLISE DO POLIMORFISMO DO DNA GENÔMICO

Vinte e nove amostras foram selecionadas para o ensaio de PFGE e este gerou perfis nítidos (Figura 5.8) para a análise de possíveis similaridades genéticas entre isolados do esgoto e isolados clínicos. Os resultados revelaram um considerável grau de polimorfismo entre as cepas estudadas. Porém, esta análise permitiu a identificação de isolados clínicos e isolados obtidos no esgoto relacionados geneticamente. Dezenove genótipos (A-S) foram caracterizados com similaridade mínima de 85% entre os perfis (Figura 5.9).

Entre os genótipos, destacou-se o genótipo Q, que pode ser caracterizado em dois isolados clínicos de pacientes hospitalizados distintos e um isolado do efluente clorado. As amostras de *K. pneumoniae* do complexo clonal Q foram caracterizadas, fenotipicamente e genotipicamente, como bactérias multirresistentes produtoras de carbapenemases do tipo

KPC. Outras beta-lactamases (TEM, SHV e CTX-M) também foram observadas neste genótipo. Vale ressaltar também o genótipo P, caracterizado em um isolado clínico e um isolado do efluente clorado, ambos multirresistentes e produtores de ESBL. É importante considerar o número reduzido de amostras submetidas à PFGE. Ainda assim, estes resultados sugerem que micro-organismos patogênicos associados às infecções nosocomiais podem ser disseminados pelos efluentes hospitalares.

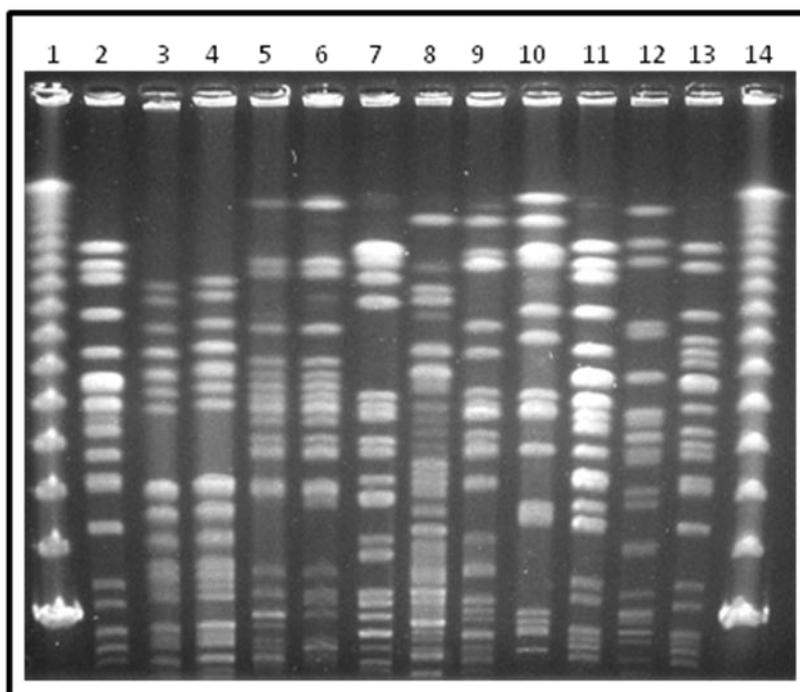


Figura 5.8 Gel representativo com os perfis de eletroforese em gel de campo pulsado. 1- Padrão de peso molecular; 2- 1977 *K. pneumoniae*; 3- 1980 *E. cloacae*; 4- 1981 *E. cloacae*; 5- 2107 *K. pneumoniae*; 6- 2108 *K. pneumoniae*; 7- 2109 *K. pneumoniae*; 8- 2113 *K. pneumoniae*; 9- 4989 *K. pneumoniae*; 10- 4995 *K. pneumoniae*; 11- 4996 *K. pneumoniae*; 12- 4997 *K. pneumoniae*; 13- 4999 *K. pneumoniae*; 14- Padrão de peso molecular.

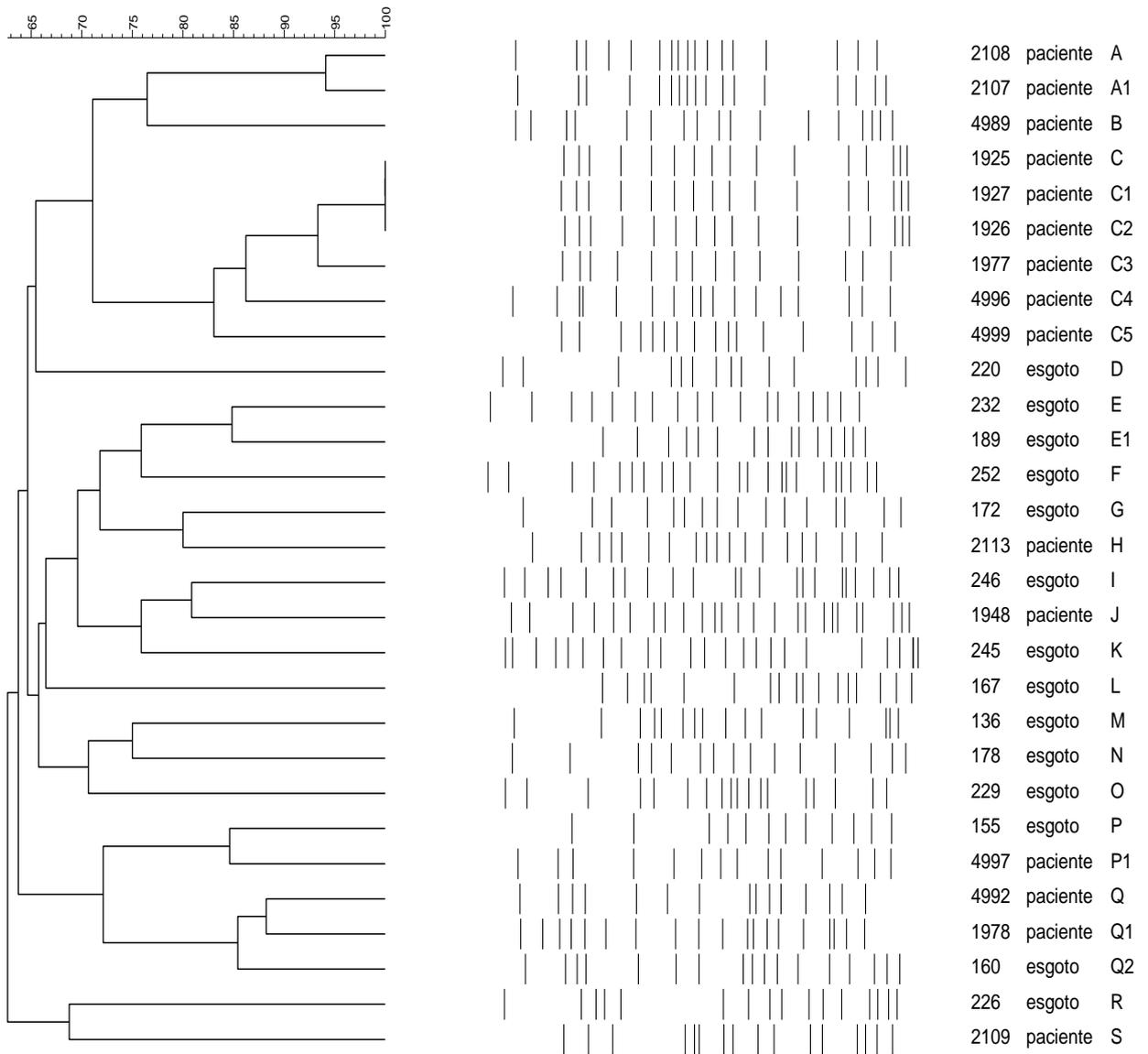


Figura 5.9 Dendrograma gerado a partir dos pulsotipos de *K. pneumoniae* obtidos pela eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE)

Parte dos resultados descritos, no presente estudo, já foi publicado e/ou submetido para publicação em revistas e eventos científicos (Anexos).

## 6 DISCUSSÃO

A presença de micro-organismos patogênicos e resistentes nas amostras estudadas demonstra a importância do monitoramento e do controle mais rigorosos do efluente final das estações de tratamento de esgoto, indicando a necessidade do estabelecimento de padrões de qualidade das águas residuais após o tratamento, inclusive no contexto da finalidade do uso dessas águas na área urbana. No Brasil, existem legislações e normatizações sobre a gestão dos resíduos sólidos urbanos e hospitalares. Porém ainda é necessária uma melhor destinação para o esgoto proveniente de estabelecimentos como os hospitais assim como ações mais efetivas no sentido de se gerar normas sobre a questão do esgoto hospitalar. Para Chitnis *et al.* (2000), embora os resíduos sólidos hospitalares tenham sido muito enfocados nos últimos anos, os resíduos líquidos permaneceram um pouco esquecidos. Embora o hospital estudado no presente trabalho possua um sistema de tratamento de esgoto em operação, esta realidade não é observada em muitas unidades de saúde situadas nos países em desenvolvimento, incluindo o Brasil. As águas residuárias podem, portanto, ser consideradas um nicho artificial na transmissão de micro-organismos patogênicos e outros agentes parasitários com distribuição geográfica cosmopolita, acompanhando o homem e outros possíveis hospedeiros.

Em 2009, Vecchia *et al.* contactaram 127 hospitais brasileiros situados, principalmente, nas regiões Sudeste e Nordeste, e observaram que apenas três possuíam algum tipo de tratamento de esgoto. Em estudo realizado em 2007, diversos tipos de sistema de tratamento de esgoto foram avaliados (escoamento superficial, filtro biológico percolador, fossa séptica com filtro anaeróbio, lagoa aerada facultativa, lagoa aerada mistura completa, lagoa anaeróbia com lagoa facultativa, lagoa facultativa, lagoa facultativa com lagoa de maturação, lodos ativados, reator UASB, reator UASB com lagoa facultativa) concluindo que os sistemas de lodo ativado não apresentaram desempenho satisfatório quanto aos padrões de confiabilidade, ou seja, houve violação dos limites preconizados pelas legislações ambientais. Segundo o mesmo estudo algumas plantas, exceto os sistemas de lodo ativado, seriam capazes de apresentar desempenhos satisfatórios, em termos de conformidade com os padrões desejados (OLIVEIRA & VON SPERLING., 2007).

Para a avaliação das condições sanitárias da água, utilizam-se as bactérias do grupo coliforme, as quais atuam como bioindicadores, uma vez que estão presentes no trato intestinal humano e de outros animais. A presença de coliformes na água indica poluição, com risco potencial da presença de organismos patogênicos e sua ausência é evidência de uma

água potável quanto ao aspecto bacteriológico. Uma preocupação permanente em torno da presença de coliformes totais e fecais é o destino e o uso dessas águas com a consequente contaminação do meio ambiente.

A contagem média de coliformes totais ( $8,4 \times 10^5$  NMP/100mL) e coliformes fecais ( $0,89 \times 10^5$  NMP/100mL) detectada no esgoto bruto (afluente hospitalar) diferiram das concentrações comumente reportadas em afluentes de esgoto doméstico. Segundo Von Sperling (2005), as concentrações de coliformes totais e termotolerantes nos afluentes domésticos, geralmente, estão entre os valores  $10^6$  a  $10^{10}$  por 100mL e entre  $10^6$  a  $10^9$  por 100mL, respectivamente. Uma possível explicação sobre a menor quantidade de coliformes expressos por NMP nos esgotos hospitalares quando comparada aos esgotos domésticos pode ser a presença de desinfetantes, antibióticos e demais produtos químicos, os quais podem ter potencial tóxico para as bactérias. Alguns estudos apresentaram concentrações de coliformes totais e fecais na ordem de  $10^3$  a  $10^6$  bactérias por 100mL, respectivamente, nos afluentes hospitalares (WEN *et al.*, 2004; EMMANUEL *et al.*, 2005; GALLERT *et al.*, 2005).

Os valores médios de coliformes totais no efluente tratado e no efluente clorado foram  $2,0 \times 10^5$  NMP/100mL e  $0,3 \times 10^5$  NMP/100mL, respectivamente. Quanto aos termotolerantes, os valores médios encontrados foram  $0,19 \times 10^5$  NMP/100mL e  $0,08 \times 10^5$  NMP/100mL. Observamos, desta forma, que os resultados obtidos com o tratamento não atendem às normas previstas na Resolução CONAMA nº 358 de 2005, que estabelece que a concentração de coliformes termotolerantes não deve ultrapassar a contagem de 1000 microorganismos por 100 mL de amostra, no caso de águas voltadas para consumo e atividades humanas. Estudos recentes relataram valores da ordem de  $10^2$  a  $10^7$  para coliformes em variadas amostras de efluentes (GALVIN *et al.*, 2010; REINTHALER *et al.*, 2010). O sistema de lodo ativado, segundo alguns trabalhos, não é muito eficiente na remoção de coliformes (VON SPERLING, 2005).

Alguns estudos sugerem que as tecnologias de tratamento de esgotos empregadas no Brasil não são eficientes na geração de efluentes adequados aos padrões de qualidade previstos na legislação, no que se refere à amônia, ao nitrogênio, ao fósforo e aos coliformes (SOARES *et al.*, 2002). Ainda assim, as possibilidades de tratamento existentes não devem ser desconsideradas para o tratamento de efluentes hospitalares, pois, mesmo sem uma redução significativa, incapaz de atingir as concentrações de coliformes desejadas, geram impacto sobre as regiões nas quais não há serviços de esgotamento adequado e onde os esgotos são lançados *in natura* em corpos hídricos receptores (IBGE, 2000).

Mesmo com a adição de cloro após o tratamento, ainda foi possível detectar bactérias coliformes nos efluentes da estação de tratamento de esgotos. O processo de desinfecção de efluentes através do cloro ainda é bastante utilizado e apresenta menores custos e maior exequibilidade. De acordo com Jordão e Pessôa (2005), dentre as principais condições que influenciam a eficácia do processo de cloração encontram-se: a natureza dos micro-organismos a serem destruídos, a natureza do desinfetante, a concentração empregada, a natureza do esgoto e o tempo de contato do desinfetante com o esgoto. No presente estudo, sugerimos que a concentração do cloro aplicada, o tempo de contato do esgoto com o cloro ou a natureza do esgoto podem ter sido o motivo pelo qual o cloro parece não ter afetado significativamente as concentrações de bactérias no tanque de cloração (desinfecção).

Embora seja um bioindicador de poluição, o grupo coliforme não oferece grandes riscos de causar doenças. Porém, cepas bacterianas isoladas do ambiente, com perfis característicos de resistência aos antibióticos, podem apresentar um risco ambiental na medida em que são capazes de disseminar a resistência para outras bactérias, inclusive às bactérias caracteristicamente patogênicas.

Entre as bactérias identificadas, o grupo das enterobactérias apresentou o maior número de espécies, com 213 isolados. Normalmente, os estudos referentes a efluentes hospitalares são voltados para micro-organismos indicadores e bactérias específicas. Em 2000, Ortolan *et al.* encontraram também as maiores contagens de bactérias da família *Enterobacteriaceae* em efluentes hospitalares. Alguns micro-organismos causadores de infecções hospitalares, tais como bacilos gram-negativos, incluindo certas enterobactérias, podem persistir por longos períodos no meio ambiente.

Com relação às enterobactérias detectadas, a espécie mais freqüente foi a *Klebsiella pneumoniae*. *Klebsiella* spp. são comumente encontradas em água, esgoto, solo e plantas. Nos seres humanos, a espécie *Klebsiella pneumoniae* está presente como um germe saprófito na nasofaringe e no trato intestinal, constituindo, dentro do gênero *Klebsiella* spp., o mais importante agente de infecções hospitalares. Os principais reservatórios para a transmissão do gênero *Klebsiella* spp. são o trato gastrintestinal e as mãos de pessoas que trabalham e circulam no ambiente hospitalar (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

Muitos tipos de microrganismos que são característicos dos esgotos tais como *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa* (ORTOLAN *et al.*, 2000; GALLERT *et al.*, 2005) foram identificados com baixas frequências. As espécies de *Citrobacter* spp. são agentes causadores de infecções hospitalares em sítios com o trato

respiratório, o trato urinário, além de infecções intra-abdominais, abscesso cerebral e bacteremias (DORAN, 1999; KIM *et al.*, 2003). Por sua vez, a *Pseudomonas aeruginosa* é uma espécie que pode estar presente na microbiota humana normal, embora isto não seja comum. Esta espécie pode causar várias doenças e ainda está fortemente associada a casos de infecção hospitalar. Esta espécie pode ainda ser encontrada no solo, na água, nos vegetais, nos animais e mesmo nos alimentos.

Entre as outras espécies de não-enterobactérias, a mais frequentemente identificada foi *Aeromonas* spp. (n=5). *Aeromonas* spp. são espécies oportunistas, características de ambientes aquáticos, podendo estar presentes também no intestino de peixes (JAY, 1998). Nos seres humanos, podem causar diarreias e outras doenças não entéricas (HURST *et al.*, 2002; HOFER *et al.*, 2006). Dentro deste gênero, a espécie *Aeromonas hydrophila* é considerada um patógeno humano raro, estando associada a infecções de tecidos causadas pelo contato de água contaminada com ferimentos na pele. Este patógeno pode ainda persistir em água tratada com cloração mais frequentemente que coliformes e outras *Aeromonas* spp. (ELWITIGALA *et al.*, 2005).

Além da presença de patógenos, estudos realizados em diferentes países detectaram a presença de antibióticos em diferentes ambientes, entre os quais estão os efluentes hospitalares e as estações de tratamento de esgoto. Os antimicrobianos detectados pertencem às diferentes classes de antibióticos tais como macrolídeos, tetraciclina, quinolonas, sulfonamidas e, principalmente, beta-lactâmicos. A presença destas drogas contribui para a seleção de bactérias e seus respectivos genes de resistência aos antibióticos no meio ambiente (KOLPIN *et al.*, 2002; KUMMERER, 2003; WATKINSON *et al.*, 2009).

A utilização indiscriminada de antimicrobianos tem causado grande impacto na saúde pública. A maioria das substâncias utilizadas são parcialmente metabolizadas pelos pacientes e descartadas na rede de esgoto dos hospitais e, posteriormente, na rede de esgoto pública. O efluente hospitalar ainda pode ser liberado no meio ambiente, principalmente nos rios ou nos demais compartimentos de água. Esses ambientes convertem-se, portanto, em importantes locais de contaminação humana por diversos patógenos, incluindo bactérias portadoras de genes de resistência a vários antimicrobianos. Elementos genéticos tais como plasmídeos podem amplificar o problema contribuindo para o aumento da multirresistência bacteriana, já que estes elementos genéticos móveis podem ser transferidos para outras bactérias de gêneros e espécies distintos (KUMMERER, 2003).

Segundo Kümmerer e Henninger (2003), as principais fontes de fármacos no ambiente hospitalar são as unidades de tratamento intensivo, onde excretas de pacientes e quimioterápicos lançados em pias e drenos são direcionadas para caixas comuns ao sistema de coleta de esgoto dos hospitais. Assim, elevadas concentrações de antimicrobianos e demais produtos, os quais são mantidos no esgoto e em estações de tratamento, fazem com que estes ambientes se tornem um importante meio de seleção de bactérias resistentes a antibióticos.

Bactérias gram-negativas resistentes a cefalosporinas, a monobactâmicos, a carbapenêmicos têm emergido e possuem uma variedade de mecanismos de resistência tais como a produção de beta-lactamases de espectro estendido, a produção de carbapenemases, as alterações nas PBPs e as alterações na permeabilidade da membrana. Tais mecanismos de resistência podem coexistir em um único patógeno (WOOD & PIERSON, 1996; PITOUT *et al.*, 1997).

Todos os isolados de *Aeromonas* spp. (n=5) identificados no presente estudo foram resistentes a cefalotina, uma cefalosporina de 1ª geração, utilizada no tratamento de endocardite bacteriana e de infecções da pele, dos tecidos moles, dos ossos, das vias urinárias, além de pneumonias e bacteremias. Neste caso, a resistência à cefalotina é intrínseca. Resistência à amicacina (n=2/5) e ao sulfametoxazol-trimetoprim (n=2/5) também foi identificada. Em 2009, Rahman *et al.* reportaram *Aeromonas* spp. resistentes à ampicilina (98%), à tetraciclina (56%), à eritromicina (93%), ao cloranfenicol (19%), ao ácido nalidíxico (70%), à cefalotina (88%), à estreptomina (81%) e à gentamicina (14%). Outro estudo, realizado por Imzilin *et al.* (1996), avaliou o efeito de um sistema de tratamento de esgoto sobre os padrões de resistência à antibióticos em *Aeromonas*, demonstrando que todas as cepas isoladas apresentaram resistência a múltiplos antibióticos, incluindo resistência à ampicilina, à amoxicilina, à cefalotina e à novobiocina. No contexto da problemática da resistência antimicrobiana, os membros do gênero *Aeromonas* são relevantes devido ao seu papel como oportunistas em gastroenterite humana e a possuírem impacto na aquicultura como patógenos de salmonídeos (trutas e salmões) e rãs. Durante as últimas décadas, o aparecimento de resistência aos antimicrobianos entre estas bactérias se tornou uma grande preocupação em muitos países, proporcionando graves perdas econômicas na produção aquícola (RAHMAN *et al.*, 2009).

*Acinetobacter* spp. é um importante patógeno nosocomial oportunista que acomete pacientes imunocomprometidos. Neste trabalho, foram isolados dois *Acinetobacter baumannii*, as quais apresentaram o mesmo perfil de resistência (amicacina, ciprofloxacina,

piperacilina-tazobactam, cefalotina, ceftazidima e cefotaxima). Em um trabalho com efluentes hospitalares no sul do Brasil, Gussati *et al.* (2009) detectou cepas de *Acinetobacter* spp. com resistência, principalmente, à amicacina, ao aztreonam, à ceftazidima, ao cefepime, à ciprofloxacina, à gentamicina e à ticarcilina-clavulanato. Além disso, o trabalho revelou que 50% das cepas eram produtoras de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido (ESBL). Com o objetivo de investigar a resistência a antibióticos em *Acinetobacter* spp. isoladas de redes coletoras que recebem esgoto hospitalar e esgoto de indústria farmacêutica, Guardabassi *et al.* (1998) analisaram cepas destes micro-organismos frente aos antibióticos: amoxicilina, oxitetraciclina, cloranfenicol, sulfametoxazol, gentamicina e ciprofloxacina, demonstrando frequências significativas de bactérias resistentes em corpos hídricos receptores antes e após o despejo de esgoto hospitalar e de uma indústria farmacêutica. O número de cepas de *Acinetobacter* spp. multirresistentes vem aumentando e a disseminação dessas características para outras bactérias do ambiente é cada vez mais preocupante, uma vez que a microbiota ambiental pode atuar como reservatório de resistência a antimicrobianos (GUSSATI *et al.*, 2009).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* está amplamente distribuída no ambiente e é capaz de persistir por longos períodos em ambientes adversos. Além da característica intrínseca de apresentar baixos níveis de sensibilidade aos antimicrobianos, diversos mecanismos de resistência têm sido identificados em *Pseudomonas aeruginosa*, tais como a hiper-expressão de bombas de efluxo, a produção de  $\beta$ -lactamases e a perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa. Frequentemente, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam um amplo espectro de resistência, podendo ser resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008). No entanto, os dois isolados de *P. aeruginosa* provenientes do afluente (n=1) e do efluente tratado (n=1), identificados neste trabalho apresentaram um discreto espectro de resistência (somente ao sulfametoxazol-trimetoprim e à ampicilina-sulbactam). Em estudos anteriores, isolados de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes às drogas imipenem, meropenem, gentamicina, ciprofloxacina, cefepime, ticarcilina-ácido clavulânico, amicacina, ceftazidima e piperacilina-tazobactam, foram detectados em amostras de efluentes hospitalares no Brasil (FUENTEFRÍA *et al.*, 2008; FUENTEFRÍA *et al.*, 2009; FUENTEFRÍA *et al.*, 2011).

Com relação às enterobactérias, o grupo mais frequentemente identificado neste trabalho, estas foram mais resistentes à cefalotina (76,5%), à cefotaxima (47,9%), ao sulfametoxazol-trimetoprim (36,6%) e à cefoxitina (35,2%). A resistência às cefalosporinas é,

geralmente, associada à produção de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido codificadas por genes carregados por plasmídeos. A resistência a este grupo de antibióticos também envolve outros mecanismos tais como o aumento da atividade de bomba de efluxo, a perda de porina e as alterações da proteína ligadora de penicilina (PBP) (KÜMMERER, 2003). Já com relação ao sulfametoxazol-trimetoprim, um dos mecanismos de resistência a estes medicamentos pode estar, principalmente em *K. pneumoniae*, relacionado à mutação na produção de dihidrolato-redutase, perdendo-se assim a afinidade pela trimetoprima. Outra forma de resistência adquirida a esta classe de antimicrobianos inclui a síntese protéica por vias metabólicas alternativas, geralmente promovendo a produção adicional das enzimas que seriam inativadas por tais medicamentos. As maiores freqüências de sensibilidade foram encontradas para os antibióticos: imipenem (95,5%) e meropenem (97,7%). Estes carbapenemas constituem a terapia antimicrobiana de escolha para tratamento de infecções hospitalares graves causadas por gram-negativos, principalmente, por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (NORDMANN *et al.*, 2009).

Outras taxas de resistência observadas foram: 27,7% para amicacina, 21,6% para ciprofloxacina, 17,8% para piperacilina-tazobactam, 14,1% para ceftazidima e 9,4% para cefepime. Entre as cefalosporinas testadas, cefepime foi a que demonstrou melhor atividade contra as cepas de enterobactérias. Cefepime é uma cefalosporina de 4ª geração com boa atividade devido à rápida penetração pela membrana externa de bactérias gram-negativas, à sua maior afinidade pelas PBPs do que as outras cefalosporinas e à sua maior resistência à hidrólise (SADER *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2008). Cefepime tem mostrado índices de cura em torno de 95% no tratamento de pacientes hospitalizados com diversas infecções (TAVARES, 1996).

Quanto à resistência para amicacina (aminoglicosídeo), esta pode estar associada ao gene *armA*, sendo mediado por plasmídeo conjugativo com potencial, portanto, para transferência horizontal. Este gene está associado à produção de uma metiltransferase que produz metilação pós-transcricional do RNAr, acarretando uma menor suscetibilidade aos aminoglicosídeos (LEE *et al.*, 2006). A resistência às quinolonas, como a ciprofloxacina, geralmente, resulta de mutações em genes cromossômicos. Entretanto, esta resistência pode ser adquirida pelas alterações na permeabilidade das membranas dos microrganismos (TAVARES, 1996).

Num estudo realizado com bactérias fermentadoras de lactose resistentes aos antibióticos em amostras de esgoto bruto e tratado, Sturtevant e Feary (1969) observaram que

1% das bactérias apresentou multirresistência aos antibióticos. Entre estes micro-organismos, aproximadamente a metade foi capaz de transferir a resistência para outras bactérias receptoras. Além disso, não foram encontradas diferenças entre o esgoto bruto e o esgoto tratado nas estações analisadas. Em 2003, Reinthaler *et al.* avaliaram a resistência a antibióticos em três estações de tratamento de esgoto, que recebiam esgoto de origem doméstica e hospitalar e verificaram que a frequência de isolados de *Escherichia coli* resistentes foi de 12 a 18% para as penicilinas, 11 a 35% para cefalosporinas, 13 a 15% para quinolonas e 57% para tetraciclinas. De acordo com este trabalho, o esgoto hospitalar parece possuir coliformes com taxas de resistência maiores do que os isolados de esgoto sanitário.

Em 2004, Vilanova *et al.* verificaram a composição e a persistência de populações de coliformes fecais e *Enterococcus* no esgoto de diferentes estações de tratamento de esgotos, entre elas estações com sistema de lodo ativado, e observaram que estes sistemas também não conseguiram reduzir para níveis seguros, nos efluentes, as densidades destas bactérias resistentes a antibióticos. Desta forma, pode-se sugerir que bactérias resistentes são lançadas em corpos d'água, contribuindo para a disseminação da resistência no meio. Em um estudo publicado em 2009, Yang *et al.* compararam populações bacterianas de origem clínica com isolados provenientes de esgoto hospitalar e detectaram maiores taxas de resistência para os fármacos ampicilina, ampicilina-sulbactam, imipenem, cefazolina, cefuroxima, gentamicina e amicacina entre as cepas isoladas dos efluentes.

No presente trabalho, também foi possível observar bactérias multirresistentes no efluente clorado, onde maiores frequências de resistência para amicacina, sulfametoxazol-trimetoprim, piperacilina-tazobactam, cefalotina, cefoxitina, ceftazidima e cefotaxima foram detectadas. No tanque de desinfecção por cloro, existe a possibilidade de seleção de bactérias resistentes pelo agente desinfetante. Poucos estudos têm sido realizados abordando o efeito da desinfecção sobre a sobrevivência de bactérias resistentes a antimicrobianos. Murray *et al.* (1984) observaram em laboratório, um aumento significativo na porcentagem de cepas resistentes a múltiplos antibióticos após a desinfecção com cloro. Baquero *et al.* (2008) afirmam que a associação de resistência aos antibióticos e a resistência aos outros produtos industriais, como metais pesados, é muito frequente em um mesmo organismo (no mesmo plasmídeo, transposon ou integron). Não está claro, entretanto, se a cloração seleciona ou induz mudanças na resistência a antibióticos em populações bacterianas. Vários autores têm sugerido que os coliformes fecais, que são geralmente mais resistentes aos antibióticos do que outras bactérias, podem ter uma vantagem de sobrevivência nos ambientes naturais e em

águas residuais tratadas (MURRAY *et al.*, 1984). As bactérias podem ter mecanismos inespecíficos de resistência para diferentes substâncias, incluindo metais pesados, biocidas e antibióticos. Em ambos os casos, a exposição a uma substância resulta na seleção de cepas bacterianas capazes de também resistir à outra, constituindo-se assim uma co-seleção (GUARDABASSI & DALSGRAARD, 2002). Todavia, estudos mais aprofundados no intuito de esclarecer a relação entre bactérias resistentes a antibióticos e desinfetantes são ainda necessários.

Em decorrência da maior exposição ao uso continuado de antimicrobianos nos setores hospitalares, que geram o esgoto, acredita-se que este afluente, formado a partir de setores contaminados, seja um importante fator para o desenvolvimento da resistência microbiana. Segundo Mezrioui & Baleux (1994), a detecção de micro-organismos resistentes nas amostras estudadas pode ser explicada por meio de duas hipóteses: a primeira é a aquisição de fatores de resistência por cepas sensíveis aos antibióticos ao longo do sistema de tratamento de esgoto e a segunda hipótese é baseada na seleção de cepas resistentes, as quais já podiam estar presentes no esgoto bruto e que, sendo também resistentes aos fatores ambientais, puderam sobreviver, dentro deste ambiente, à estação de tratamento. A prevalência de bactérias resistentes aos antibióticos no esgoto pode variar, dependendo de vários fatores como o sistema de tratamento de esgoto analisado, o tipo de bactéria a ser estudada e o agente antimicrobiano em questão.

A elevada prevalência de resistência entre os isolados estudados parece ser um sinal alarmante de que os agentes antimicrobianos necessitam ser utilizados com mais critério pelos estabelecimentos de saúde. Todos os isolados foram considerados multirresistentes, apresentando resistência a dois ou mais antimicrobianos. Os mesmos mecanismos envolvidos no processo de resistência podem estar envolvidos no processo de multirresistência, destacando-se os mecanismos que envolvem transferência genética, nos quais é provável que possa haver a transferência de vários genes. Segundo alguns autores, por serem cepas isoladas de efluente, o fenótipo de multirresistência é frequentemente encontrado, uma vez que tais ambientes exercem forte pressão seletiva para cepas bacterianas multirresistentes e propiciam condições adequadas para a troca de informações genéticas que geram tais características (GUARDABASSI *et al.*, 1998; TENNSTEDT *et al.*, 2003). No trabalho desenvolvido por Menezes *et al.*, (2007), os autores citam que os plasmídeos são transferidos entre espécies que fazem parte da família *Enterobacteriaceae* e que o acúmulo de genes de resistência origina cepas multirresistentes.

Uma das maiores preocupações envolve o aumento nas taxas de detecção de bactérias que expressam o fenótipo de resistência contra uma grande variedade de antibióticos, o qual pode estar associado com enzimas que, geralmente, hidrolisam estes medicamentos, como as  $\beta$ -lactamases, codificadas pelo cromossomo bacteriano e por outros elementos genéticos como plasmídeos e transposons (TAVARES, 1996). Através dos resultados da presente pesquisa, foi possível observar que uma proporção expressiva (43%) do total de bactérias é produtora de ESBL, sendo a maior frequência observada no efluente clorado. Entre as produtoras de ESBL, as mais frequentemente isoladas foram cepas de *K. pneumoniae*. A emergência deste patógeno produtor de  $\beta$ -lactamase de espectro estendido já foi relatada em todo o mundo como importante causa de infecção hospitalar. Além disso, *K. pneumoniae* é uma importante fonte de transmissão de genes de resistência entre bactérias da mesma espécie e entre espécies não correlacionadas (BUSH, 2001; GNIADKOWSKI, 2001). Prado *et al.* (2008) detectaram a presença de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (20/43) no efluente e no lodo de uma estação de tratamento de hospital público do Rio de Janeiro. Vale destacar também a detecção de um isolado não caracterizado como enterobactéria, a espécie *Aeromonas* spp., produtora de ESBL.

Desde o seu reconhecimento inicial, estas enzimas (ESBL) têm sofrido alterações bioquímicas substanciais e têm sido detectadas em todo o mundo. A prevalência da detecção destas enzimas bem como das espécies bacterianas e das características fenotípicas dos isolados produtores de ESBL, variam conforme o país ou a região de abrangência do estudo. No entanto, *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. são as espécies relacionadas a ESBL mais frequentemente encontradas (FREITAS *et al.*, 2003; KOTAPATI *et al.*, 2005). ESBLs foram encontradas em 30% a 60% das amostras de *Klebsiella* isoladas de unidades de terapia intensiva no Brasil, Colômbia e Venezuela (SASAKI *et al.*, 2010). Gales *et al.* (2002) reportaram altas prevalências de *K. pneumoniae* (55%) e *E. coli* (10%) ESBL-positivas na América do Sul. Nos últimos anos tem havido uma grande variedade de relatórios de infecções comunitárias causadas por organismos produtores de ESBL (SASAKI *et al.*, 2010). Vários patógenos adquiridos na comunidade, comumente associados à diarreia, foram caracterizados como produtores de ESBL em estudos anteriores (PATERSON & BONOMO, 2005). Neste estudo, a alta prevalência de bactérias produtoras de ESBL confirma os dados publicados acerca da emergência do problema das bactérias resistentes à maioria dos antimicrobianos usados atualmente na clínica médica, demonstrando que elas estão presentes tanto no ambiente intra-hospitalar, quanto em amostras ambientais.

Os isolados produtores de ESBL, além da resistência aos beta-lactâmicos, apresentaram co-resistência a outras classes de antimicrobianos. Bactérias produtoras de ESBL frequentemente abrigam plasmídeos que também carregam genes codificadores de resistência aos aminoglicosídeos, ao sulfametoxazol-trimetoprim e às quinolonas (PATERSON & BONOMO, 2005). Recentes pesquisas, realizadas em alguns países europeus e nos Estados Unidos, alertam para uma tendência alarmante na associação da resistência a outras classes de antibióticos entre os organismos produtores de ESBL isolados. Tais pesquisas demonstraram que *E. coli* produtoras de ESBL, especialmente as produtoras de CTX-M, exibiram co-resistência ao sulfametoxazol-trimetoprim, à tetraciclina, à gentamicina e à ciprofloxacina (PITOUT *et al.*, 2004; POURNARAS *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-BAÑO *et al.*, 2004; BRIGANTE *et al.*, 2005).

Genotipicamente, entre os isolados produtores de ESBL foi possível identificar as três principais famílias de  $\beta$ -lactamases (TEM, SHV e CTX-M) através da PCR. Em concordância com outros estudos em isolados clínicos, a grande maioria (82%) dos isolados apresentou genes codificadores para o tipo TEM de ESBL. Algumas enzimas TEM podem não ser de espectro estendido, como TEM-1 e TEM-2, e o sequenciamento dos genes *bla*<sub>TEM</sub> detectados forneceria uma identificação mais exata dos mesmos (BRADFORD, 2001). As frequências dos genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> foram de 48% e 67%, respectivamente. Assim como o grupo TEM, a maioria das enzimas SHV são ESBL e, sendo assim, o sequenciamento destes genes permitiria saber se eles são codificadores ou não de ESBL. Com relação à ESBL do tipo CTX-M, este grupo é o mais comum entre as ESBLs que não pertencem aos grupos TEM e SHV. Dados da literatura relatam uma maior frequência das enzimas CTX-M na América do Sul, principalmente no Brasil e na Argentina (MINARINI *et al.*, 2007) e, nos últimos anos, mais de 50 enzimas foram descritas no mundo. Em 2010, Reinthaler *et al.* (2010) detectaram ESBL dos tipos TEM e CTX-M entre *E. coli* produtoras de ESBL isoladas a partir de esgotos domésticos e hospitalares. A ocorrência de mais de um tipo de ESBL em um mesmo isolado é bastante comum, sendo a associação mais frequente a dos tipos TEM e SHV. Estas combinações foram descritas em vários estudos no Brasil (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Neste trabalho, a associação mais encontrada foi *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>. Estudos anteriores já demonstraram que os plasmídeos mediadores de ESBL podem transportar mais de um gene de  $\beta$ -lactamases, tais como *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> (WOODFORD *et al.*, 2009).

Entre os 18 isolados de *Enterobacteriaceae* que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida a pelo menos um carbapenema testado, a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi

detectada em apenas dois isolados do esgoto com sensibilidade reduzida nos testes fenotípicos. A resistência aos carbapenêmicos pode envolver vários mecanismos combinados: modificações na membrana externa, permeabilidade e aumento da regulação dos sistemas de efluxo, associado com hiperprodução de  $\beta$ -lactamases AmpC (cefalosporinases) ou ESBL, e produção de carbapenemases (NORDMANN *et al.*, 2009). Os produtores de carbapenemase do tipo KPC também acumularam outras  $\beta$ -lactamases testadas. Segundo Peirano *et al.* (2009), evidências atuais sugerem que a importância e a prevalência das carbapenemases podem ser clinicamente despercebidas devido ao fato de que carbapenemases KPC podem não conferir resistência total aos carbapenêmicos, mas apenas uma reduzida sensibilidade; e também ao fato de que a maioria dos produtores de KPC são também produtores de ESBL. Recentemente, no Brasil, tem sido relatada a presença da enzima KPC em amostras, principalmente, de *K. pneumoniae*, associadas a vários surtos em Pernambuco, Distrito Federal, Rio de Janeiro, São Paulo e demais estados, confirmando uma disseminação dessa enzima na América Latina e também no Brasil. A localização do gene *bla*<sub>KPC</sub> tem sido observada em plasmídeos de diversos tamanhos, podendo ser identificadas mais de uma cópia do gene, demonstrando assim sua alta capacidade de mobilização (MONTEIRO *et al.* 2009; NORDMANN *et al.*, 2009).

A velocidade da emergência e da disseminação de genes de resistência tem grandes implicações, que podem ser verificadas através da existência de diferentes perfis de sensibilidade assim como da crescente resistência aos antimicrobianos no decorrer do tempo (SADER, 2000; NISHIO *et al.*, 2004). A presença de bactérias resistentes no meio ambiente torna-se um problema para a saúde pública. A seleção destes micro-organismos na natureza pode estar relacionada com a presença de antibióticos no solo, nos animais e nos produtos agrícolas. Reservas naturais destes genes de resistência podem tornar-se uma origem a partir da qual estas características poderiam ser transmitidas para patógenos emergentes (ASH *et al.*, 2002).

Considerando os tipos clonais encontrados em *K. pneumoniae*, o método de PFGE foi realizado em 29 isolados multirresistentes produtores de ESBL. Assim, 19 perfis diferentes foram caracterizados, demonstrando assim considerável grau de diversidade. No entanto, a análise de agrupamentos dos perfis gerados pela PFGE demonstrou relação clonal entre isolados de efluentes hospitalares e isolados clínicos, indicando que populações bacterianas do ambiente hospitalar também se estabelecem no esgoto hospitalar e podem se disseminar para a comunidade. Perfis de resistência bacteriana podem ser encontrados em amostras

ambientais e em amostras clínicas, indicando também que ambientes que provocam uma maior seleção de micro-organismos resistentes, como os hospitais, têm maior potencial para disseminar micro-organismos resistentes no ambiente, principalmente através das águas residuais. Ainda não são bem conhecidas as interações entre os ambientes, os medicamentos e as bactérias presentes em águas residuais e nem as taxas de transferência genética entre as espécies nestes ambientes, embora se acredite que isto ocorra com frequência.

Diante do que foi exposto neste estudo, faz-se necessário dar mais atenção às questões referentes à composição dos efluentes hospitalares, assim como ao tratamento e à destinação adequados dos mesmos. Segundo a Resolução nº. 357 de 2005 do CONAMA, a disposição de efluentes no solo, nos rios, etc não poderá causar poluição ou contaminação das águas, gerando a deterioração da qualidade do ambiente. Torna-se, portanto, imprescindível uma fiscalização intensa dos órgãos ambientais e gestores de recursos hídricos para manter as instalações de tratamento em operação, em condições de funcionamento para o cumprimento da resolução.

## 7 CONCLUSÕES

- Nas amostras coletadas na estação de tratamento de esgoto, quantidades significativas de bactérias resistentes aos antibióticos foram detectadas, destacando os resultados referentes às amostras coletadas em efluentes tratados com cloro (desinfecção).
- Considerando as bactérias gram-negativas isoladas a partir de amostras obtidas, em todos os pontos de coleta, foram identificados diferentes gêneros. As espécies predominantemente isoladas foram as enterobactérias. Bactérias de outros gêneros como *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Stenotrophomonas* e *Aeromonas* puderam ser isoladas através dos meios de cultura utilizados, demonstrando assim que elas também estão presentes nos efluentes hospitalares.
- As enzimas ESBL frequentemente caracterizadas (TEM, SHV e CTX-M) no ambiente intra-hospitalar foram também identificadas em todas as amostras de esgoto analisadas, sendo portanto produzidas por micro-organismos capazes de resistir ao sistema de tratamento e cloração.
- Carbapenemases do tipo KPC, até então encontradas apenas em pacientes hospitalizados, foram detectadas, genotipicamente e fenotipicamente, em amostras de esgoto proveniente do hospital, mesmo após todo o processo de tratamento.
- Os resultados da análise do polimorfismo do DNA genômico indicaram que bactérias envolvidas em infecções hospitalares, isoladas de pacientes, são geneticamente relacionadas àsquelas identificadas no esgoto hospitalar, reforçando a ideia de que os efluentes hospitalares podem ser um veículo de disseminação de micro-organismos patogênicos e/ou resistentes para o ambiente.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos dados levantados neste trabalho, observa-se que o tema “resíduos dos serviços de saúde” engloba várias questões e necessita do envolvimento de profissionais de diversas áreas do conhecimento. O gerenciamento destes resíduos ainda é um assunto polêmico e deve continuar sendo pesquisado de forma a abordar os aspectos inerentes a sua gestão intra e extra-hospitalar. Nesse sentido, considera-se que há ainda um vasto campo de investigação a ser explorado. Os resultados sugerem que o esgoto hospitalar compreende um objeto de estudo complexo e apresenta uma ampla diversidade de micro-organismos a serem estudados.

Os resíduos hospitalares, como os efluentes, fornecem condições de sobrevivência e reprodução aos micro-organismos patogênicos, sendo necessários cuidados na manipulação, desde a coleta interna até a destinação final dos resíduos. A legislação deveria conter critérios de lançamentos de efluentes hospitalares mais específicos e definidos, principalmente, no que diz respeito ao desenvolvimento dos sistemas de tratamento nos hospitais e demais estabelecimentos de saúde.

As informações geradas trazem novos conhecimentos sobre a ocorrência de ESBL e carbapenemase do tipo KPC, a qual ainda não havia sido descrita fora do ambiente hospitalar. Poucos estudos, no Brasil, dão ênfase a detecção de ESBL e outros mecanismos de resistência no ambiente extra-hospitalar e na comunidade. Os resultados confirmam a emergência da difusão de bactérias resistentes produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), as quais conferem altas taxas de resistência contra a maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

Atualmente, um tema importante na área da saúde corresponde ao uso incorreto de antimicrobianos na prática clínica e o consequente aumento na proporção de bactérias resistentes aos antimicrobianos, principalmente, no ambiente hospitalar, onde as bactérias multirresistentes encontram-se mais facilmente. Assim, a presença destas bactérias em efluentes hospitalares favorece a disseminação das mesmas. Os resultados corroboram a emergência do problema da difusão de bactérias resistentes a antibióticos, mas também que as mesmas estão presentes em proporções significativas em outros ambientes, tais como os efluentes hospitalares.

Existe uma grande possibilidade de bactérias resistentes presentes nos efluentes hospitalares chegarem aos efluentes domésticos e/ou corpos hídricos, o que em contato com a

comunidade poderia causar problemas de saúde pública bem como ser um possível causador de impactos ambientais. Ainda é difícil descrever e avaliar os impactos ecológicos e evolutivos da dispersão de bactérias resistentes e seus respectivos genes de resistência a antimicrobianos no meio ambiente.

Melhorias no sistema de tratamento de esgoto hospitalar são fundamentais. O sistema de tratamento deveria funcionar como barreiras, minimizando a quantidade de microrganismos presentes no efluente, porém não está cumprindo com o seu papel, além de disseminar bactérias resistentes e multirresistentes. É necessário que o Estado, através de órgãos públicos, apóie com financiamento e parcerias, investimentos em estações de tratamento de esgoto para hospitais; e façam o monitoramento contínuo dos efluentes de hospitais juntamente com medidas sanitárias com o objetivo de impedir a disseminação de genes de resistência bacteriana no meio ambiente.

A pesquisa desenvolvida contribuiu para difusão dos conhecimentos acerca dos sistemas de tratamento de esgoto que possam reduzir ou eliminar agentes patogênicos do meio ambiente, além de demonstrar que os efluentes hospitalares são fontes importantes de contaminação microbiológica. O estudo ganha relevância, sobretudo, para regiões com condições de saneamento precárias, cujos esgotos, independentemente dos locais de origem, são lançados *in natura* nos corpos receptores. Poucos estudos são realizados no Brasil visando uma investigação mais sistemática sobre a caracterização e a periculosidade dos tipos de efluentes e o real impacto que o lançamento deles provocaria no ambiente ou à saúde pública, caso não sejam adequadamente tratados.

Considerando os objetivos propostos e os resultados obtidos, é possível concluir que os mesmos foram atingidos. Porém algumas recomendações são sugeridas para fornecer conhecimentos adicionais sobre a problemática:

i) Estudos comparando as concentrações de bactérias resistentes a antibióticos entre efluentes hospitalares e domésticos são fundamentais. Alguns dados publicados indicam que os efluentes hospitalares conteriam concentrações maiores de bactérias resistentes aos antibióticos se comparados com efluentes provenientes de outras fontes.

ii) A viabilidade de microrganismos patogênicos, especificamente, bactérias resistentes a antibióticos, em determinados ambientes e após serem lançados em um corpo receptor, ainda é pouco conhecida. Os riscos de contaminação dos corpos receptores e até mesmo da comunidade dependem da sobrevivência dos microrganismos nestes ambientes.

Dessa forma, estudos sobre a viabilidade de bactérias resistentes a antibióticos em outros ambientes são pertinentes.

iii) Os efluentes hospitalares contêm uma concentração elevada de medicamentos, dentre eles os antibióticos, que poderiam exercer uma pressão seletiva contribuindo para o aumento da frequência de bactérias resistentes aos antibióticos. Com isso, estudos sobre a persistência de antimicrobianos no efluente hospitalar e no meio ambiente são importantes.

iv) Neste trabalho, cepas geneticamente relacionadas foram isoladas em pacientes hospitalizados e nos efluentes hospitalares. E ainda assim, o estudo da genotipagem de um número maior de cepas bacterianas nos efluentes e no ambiente intra hospitalar, além de outros ambientes, também é interessante para tentar esclarecer a origem de surtos e/ou as rotas de disseminação destes micro-organismos.

v) Além disso, torna-se relevante que outros sistemas de tratamento de esgoto hospitalar sejam investigados de modo a avaliar a existência destes sistemas bem como sua efetividade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-AHMAD A, DASHNER FD, KÜMMERER K. Biodegradability of Cefotiam, Ciprofloxacin, Meropenem, Penicilin G and Sulfametazole and Inhibition of Waste Water Bacteria. Arch Env Contam Toxicol 1999; 37(2): 158-163.

AMBLER RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 1980; 289(1036): 321-331.

APHA. American Public Health Association. Standard Methods for the Examination Water and Wastewater. 20 ed. Washington: American Public Health Association; 1998.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n.º 306, de 07 de dezembro de 2004. Dispõe sobre o Regulamento Técnico para o Gerenciamento de Resíduos de Serviços de Saúde. Diário Oficial [da República Federativa do Brasil] Brasília, 10 dez. 2004.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Clínica (Manual-Módulo V). 2005. [Acesso em 03 fev. 2009] Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e03a7c0043390bc6aa1aaeff30613c2e/mod\\_5\\_2004.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e03a7c0043390bc6aa1aaeff30613c2e/mod_5_2004.pdf?MOD=AJPERES).

ANTONIO NS, OLIVEIRA AC, CANESINI R, ROCHA JR. Mecanismos de resistência bacteriana. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária [online]. 2009. [Acesso em 11 jul. 2009]; 7(12). Disponível em: <http://www.revista.inf.br/veterinaria/>.

ASH RJ, MAUCK B, MORGAN M. Antibiotic Resistance of gram-negative bacteria in rivers, United States. Emerg Infect Dis 2002; 8(7): 713-716.

AYAN M, DURMAZ R, AKTAS E, DURMAZ B. Bacteriological, clinical and epidemiological characteristics of hospital-acquired *Acinetobacter baumannii* infections in a teaching hospital. J Hosp Infect 2003; 54(1): 39-45.

BAQUERO F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2004; 2(6): 510-518.

BAQUERO F, MARTÍNEZ JL, CANTÓN R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* 2008; 19(3): 260-265.

BERQUÓ LS, BARROS AJD, LIMA RC, BERTOLDI AD. Utilização de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias na comunidade. *Rev Saúde Pública* 2004; 38(3): 358-364.

BIENDO M, THOMAS D, LAURANS G, HAMDAD-DAOUDI F, CANARELLI B, ROUSSEAU F, CASTELAIN S, EB F. Molecular diversity of *Proteus mirabilis* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in French university hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(5): 395-401.

BILA DM, DEZOTTI M. Fármacos no meio ambiente. *Quím Nova* 2003; 26(4): 523-530.

BONNET R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 1-14.

BRADFORD PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(4): 933-951.

BRASIL. Lei nº. 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]* Brasília, 7 jan. 1997. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L9431.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9431.htm).

BRASIL. Ministério de Estado da Saúde. Portaria n.º 2.616, de 12 de maio de 1998. Regulamenta as ações de controle de infecção hospitalar no país, em substituição a Portaria MS 930 de 27 de agosto de 1992. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]* Brasília, 13 maio 1998. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616\\_98.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616_98.htm).

BRIGANTE G, LUZZARO F, PERILLI M, LOMBARDI G, COLÌ A, ROSSOLINI GM, AMICOSANTE G, TONIOLO A. Evolution of CTX-M-type beta-lactamase in isolates of *Escherichia coli* infecting hospital and community patients. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 25(2): 157-162.

BROWN KD, KULIS J, THONSON B, CHAPMAN TH, MAWHINNEY DB. Occurrence of antibiotics in hospital, residential, and dairy effluent, municipal wastewater, and the Rio Grande in New Mexico. *Sci Total Environ* 2006; 366: 772-783.

BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6): 1211-1233.

BUSH K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 3(7): 1085-1089.

BYDLOWSKI CR, WESTPHAL MF, PEREIRA IMTB. Promoção da saúde: porque sim e porque ainda não! *Saúde Soc* 2004; 13(1): 14-24.

CAI TM, GUAN LB, CHEN LW, CAI S, LI XD, CUI ZL, LI SP. Enhanced Biological Phosphorus removal with *Pseudomonas putida* GM6 from Activated Sludge. *Pedosphere* 2007; 17(5): 624-629.

CALIJURI ML, SANTIAGO AF, CAMARGO RA, MOREIRA NETO RF. Estudo de indicadores de saúde ambiental e de saneamento em cidade do Norte do Brasil. *Eng Sanit Ambient* 2009; 14(1): 19-28.

CAO V, LAMBERT T, NHU DQ, LOAN HK, HOANG NK, ARLET G, COURVALIN P. Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12): 3739-3743.

CARATTOLI A. Animal reservoirs for extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(Suppl. 1): 117-123.

CARVALHO KR, CARVALHO-ASSEF APD, PEIRANO G, SANTOS LCG, PEREIRA MJF, ASENSI MD. Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying *bla*<sub>OXA-23</sub> collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34(1): 25-28.

CASTRO MS, PILGER D, FERREIRA MBC, KOPITTKE L. Tendências na utilização de antimicrobianos em um hospital universitário, 1990-1996. *Rev Saúde Pública* 2002; 36(5): 553-558.

CHITNIS V, CHITNIS D, PATIL S, KANT R. Hospital effluent: A source of multiple drug-resistant bacteria. *Curr Sci* 2000; 79(7): 989-991.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100–S19. Wayne, PA: CLSI; 2009.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Conselho Resolução nº. 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]* Brasília, 18 mar. 2005; Seção 1, p. 58-63. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº. 358, de 29 de abril de 2005. Dispõe sobre o tratamento e a disposição final dos resíduos dos serviços de saúde e dá outras providências. *Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]* Brasília, 04 mar. 2005. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35805.pdf>.

COUTO RC, PEDROSA TMG, NOGUEIRA JM. Infecção hospitalar e outras complicações não-infecciosas da doença: epidemiologia, controle e tratamento. 3 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2003.

COQUE TM, OLIVER A, PÉREZ-DÍAZ JC, BAQUERO F, CANTÓN R. Genes encoding TEM-4, SHV-2 and CTX-M10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple

*Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(2): 500-510.

COSTANZO SD, MURBY J, BATES J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environmental. *Mar Pollut Bull* 2005; 5: 218-223.

CUNHA MA, SILVA MR. Métodos de detecção de micro-organismos indicadores. *Saúde & Ambiente em Revista* 2006; 1(1): 9-13.

DAVISON J. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* 1999; 42(2): 73-91.

DEL FIOL FS, LOPES LC, TOLEDO MI, BARBERATO-FILHO S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010; 43(1): 68-72.

DENOBILO M, NASCIMENTO ES. Validação de método para determinação de resíduos dos antibióticos oxitetraciclina, tetraciclina, clortetraciclina e doxiciclina, em leite, por cromatografia líquida de alta eficiência. *Rev Bras Cienc Farm* 2004; 40(2): 209-218.

DIENSTMANN R, PICOLI SU, MEYER G, SCHENKEL T, STEYER J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. *J Bras Patol Med Lab* 2010; 46(1): 23-27.

DIWAN V, TAMHANKAR AJ, AGGARWAL M, SEN S, KHANDAL RK, LUNDBORG CS. Detection of antibiotics in hospital effluents in India. *Curr Sci* 2009; 97(12): 1752-1755.

DORAN TI. The role of *Citrobacter* in clinical disease of children: review. *Clin Infect Dis* 1999; 28(2): 384-394.

DORNE JL, SKINNER L, FRAMPTON GK, SPURGEON DJ, RAGAS AM. Human and environmental risk assessment of pharmaceuticals: differences, similarities, lessons from toxicology. *Anal Bioanal Chem* 2007; 387(4): 1259-1268.

DU BOIS SK, MARRIOT MS, AMYES SG. TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35(1): 7-22.

DUONG HA, PHAM NH, NGUYEN HT, HOANG TT, PHAM HV, PHAM VC, BERG M, GIGER W, ALDER AC. Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* 2008; 72(6): 968-973.

DZIC S, BEDEKOVIC V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24(6): 519-526.

ELWITIGALA JP, HIGGS DS, NAMNYAK S, WHITE JW, YANEZA A. Septic arthritis due to *Aeromonas hydrophila*: case report and review of the literature. *Int J Clin Pract* 2005; 59(147): 121-124.

EMMANUEL E, PERRODIN Y, KECK G, BLANCHARD JM, VERMANDE P. Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazardous Mat* 2005; 117(1): 1-11.

ENDIMIANI A, LUZZARO F, BRIGANTE G, PERILLI M, LOMBARDI G, AMICOSANTE G, ROSSOLINI GM, TONIOLO A. *Proteus mirabilis* bloodstream infections: risk factors and treatment outcome related to the expression of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(7): 2598-2605.

ESSACK SY, HALL LM, PILLAY DG, MCFAYEN ML, LIVERMORE DM. Complexity and diversity of *K. pneumoniae* strains with ESBL isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(1): 88-95.

FORBES BA, SAHM DF, WEISSFELD AS. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 10 ed. St. Louis: Mosby; 1998.

FREITAS ALP, MACHADO DP, SOARES FSC, BARTH AL. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian Teaching Hospital: Detection, Prevalence and Molecular Typing. Braz J Microbiol 2003; 34(4): 344-348.

FUENTEFRIA DB, FERREIRA AE, GRÄF T, CORÇÃO G. *Pseudomonas aeruginosa*: spread of antimicrobial resistance in hospital effluent and surface water. Rev Soc Bras Med Trop 2008; 41(5): 470-473.

FUENTEFRIA DB, FERREIRA AE, GRÄF T, CORÇÃO G. Spread of Metallo- $\beta$ -lactamases: screening reveals the presence of a *bla*<sub>SPM-1</sub> gene in hospital sewage in southern Brazil. Braz J Microbiol 2009; 40(1): 82-85.

FUENTEFRIA DB, FERREIRA AE, CORÇÃO G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? J Environ Manage 2011; 92(1): 250-255.

FUNASA. Fundação Nacional de Saúde. Manual prático de análise de água. Brasília; 2006. [Acesso em 2 set. 2010] Disponível em: <http://www.funasa.gov.br/Web%20Funasa/pub/pdf/Mnl%20analise%20agua.pdf>.

GALES AC, SADER HS, JONES RN, SENTRY PARTICIPANTS GROUP (Latin America). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). Diagn Microbiol Infect Dis 2002; 44(3): 289-299.

GALLERT C, FUND K, WINTER J. Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. Appl Microbiol Biotechnol 2005; 69(1): 106-112.

GALVÃO JUNIOR AC, NISHIO SR, BOUVIER BB, TUROLLA FA. Marcos regulatórios estaduais em saneamento básico no Brasil. Rev Adm Pública 2009; 43(1): 207-227.

GALVIN S, BOYLE F, HICKEY P, VELLINGA A, MORRIS D, CORMICAN M. Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. *Appl Environ Microbiol* 2010; 76(14): 4772–4779.

GASKINS HR, COLLIER CT, ANDERSON DB. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim Biotechnol* 2002; 13(1): 29-42.

GAUTAM AK, KUMAR S, SABUMON PC. Preliminary study of physico-chemical treatment options for hospital wastewater. *J Environ Manage* 2007; 83(3): 298-306.

GAYNES R, EDWARDS JR, NATIONAL NOSOCOMIAL INFECTIONS SURVEILLANCE SYSTEM. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. *Clin Infect Dis* 2005; 41(6): 848-854.

GIATTI LL, ROCHA AA, SANTOS FA, BITENCOURT SC, PIERONI SRM. Condições de saneamento básico em Iporanga, Estado de São Paulo. *Rev Saúde Pública* 2004; 38(4): 571-577.

GIATTI LL. Reflexões sobre água de abastecimento e saúde pública: um estudo de caso na Amazônia brasileira. *Saúde Soc* 2007; 16(1): 134-144.

GIGER W, ALDER AC, GOLET EM, KOHLER HPE, MCADELL CS, MOLNAR E, SIEGRIST H, SUTER MJF. Occurrence and fate of antibiotics as trace contaminants in wastewaters, sewage sludges, and surface waters. *Chimia* 2003; 57(9): 485-491.

GOLD HS, MOELLERING JR RC. Antimicrobial Drug Resistance. *New Engl J Med* 1996; 335: 1445-1453.

GONÇALVES RF, CHERNICHARO CAL, NETO COA, SOBRINHO PA, KATO MT, COSTA RHR, AISSE MM, ZAIAT M. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por reatores com biofilme. [Acesso em 25 out. 2010]. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap-4.pdf>.

GNIADKOWSKI M, SCHNEIDER I, PALUCHA A, JUNGWIRTH R, MIKIEWICZ B, BAUERNFEIND A. Cefotaxime-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates from Hospital in Warsaw, Poland: Identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase That is Closely Related to the CTX-M-1/MEN-1 Enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(4): 827-832.

GNIADKOWSKI M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) and ESBL-producing microorganisms. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7(11): 597-608.

GUARDABASSI L, PETERSEN A, OLSEN JE, DALSGAARD A. Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from Sewers Receiving Waste Effluent from a Hospital and a Pharmaceutical Plant. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(9): 3499-3502.

GUARDABASSI L, DALSGAARD A. Occurrence and fate of antibiotic resistant bacteria in sewage. Environmental Project No. 722, Miljøprojekt, 2002. [Acesso em 28 out. 2010] Disponível em: <http://www.miljoindflydelse.dk/udgiv/publications/2002/87-7972-266-0/pdf/87-7972-267-9.pdf>.

GUSATTI CS, FERREIRA AF, FUENTEFRIA DB, CORÇÃO G. Resistência a  $\beta$ -lactâmicos em *Acinetobacter* spp isolados de efluente hospitalar no sul do Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2009; 42(2): 183-187.

HALLING-SØRENSEN B, NIELSEN SN, LANZKY PF, INGERSLEV F, HOLTEN LÜTZHØFT HC, JORGENSEN SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment-A review. *Chemosphere* 1998; 36(2): 357-393.

HASMAN H, MEVIUS D, VELDMAN K, OLESEN I, AARESTRUP FM.  $\beta$ -lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1): 115-121.

HELLER L. Saneamento e saúde. Brasília: OPS/OMS; 1997.

HELLER L. Relação entre saúde e saneamento na perspectiva do desenvolvimento. *Cienc Saúde Coletiva* 1998; 3(2): 73-84.

HÉRITIER C, POIREL L, LAMBERT T, NORDMANN P. Contribution of Acquired Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinases to Carbapenem Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(8): 3198-3202.

HEUER H, KRÖGERRECKLENFORT E, WELLINGTON EMH, EGAN S, VAN ELSAS JD, VAN OVERBEEK L, COLLARD JM, GUILLAUME G, KARAGOUNI AD, NIKOLAKOPOULOU TL, SMALLA K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; 42(2): 289-302.

HIRSCH R, TERNES TA, HABERER K, KRATZ KL. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *Sci Total Environ* 1999; 225:109-118.

HOFER E, REIS CMF, THEOPHILO GND, CAVALCANTI VO, LIMA NV, HENRIQUES MFCM. Envolvimento de *Aeromonas* em surto de doença diarréica aguda em São Bento do Una, Pernambuco. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006; 39(2): 217-220.

HOWARD C, VAN DAAL A, KELLY G, SCHOONEVELDT J, NIMMO G, GIFFARD PM. Identification and Minisequencing-Based Discrimination of SHV  $\beta$ -Lactamases in Nosocomial Infection-Associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(3): 659-664.

HURST CJ, CRAWFORD RL, KNUDSEN GR, MCINERNEY MJ, STETZENBACH LD. *Manual of Environmental Microbiology*. 2 ed. Washington, DC: American Society for Microbiology Press; 2002.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico 2000. [online] Brasil; 2000. [Acesso em 07 nov. 2010]. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/27032002pnsb.shtm>.

IMZILIN B, LAFDAL YMO, JANA M. Effect of wastewater stabilization ponds on antimicrobial susceptibility and haemolysin occurrence among motile *Aeromonas* strains. World J Microbiol Biotechnol 1996; 12(4): 385-390.

JARLIER V, NICOLAS MH, FOURNIER G, PHILIPPON A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 1988; 10(4): 867-878.

JAY JM. Modern Food Microbiology. 5 ed. Gaithersburg: An Aspen; 1998.

JOLIBOIS B, GUERBET M, VASSAL S. Glutaraldehyde in Hospital Wastewater. Arch Environ Contam Toxicol 2002; 42(2):137-144.

JORDÃO EP, PESSÔA CA. Tratamento de Esgoto Doméstico. 4 ed. Rio de Janeiro: Segrac; 2005.

KEMPER N. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment. Ecol Indic 2008; 8(1):1-13.

KIM PW, HARRIS AD, ROGHMANN MC, MORRIS JR JG, STRINIVASAN A, PERENCEVICH EN. Epidemiological Risk Factors for Isolation of Ceftriaxone-Resistant versus Susceptible *Citrobacter freundii* in Hospitalized Patients. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47(9): 2882-2887.

KIM SC, CARLSON K. Occurrence of ionophore antibiotics in water and sediments of a mixed-landscape watershed. Water Res 2006; 40(13): 2549-2560.

KNOTHE H, SHAH P, KRCMERY V, ANTAL M, MITSUHASHI S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection 1983; 11(6): 315-317.

KOLPIN DW, FURLONG ET, MEYER MT. Pharmaceuticals, hormones, and other organism wastewater contaminants in U.S. streams. 1999-2000: A National Reconnaissance. Environ Sci Technol 2002; 36(6): 1202-1211.

KOLPIN DW, SKOPEC M, MEYER MT, FURLONG ET, ZAUGG SD. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. Sci Total Environ 2004; 328: 119-130.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WM, SCHRECKENBERGER PC, WINN JR WC. Diagnóstico Microbiológico - Texto e Atlas Colorido. 5 ed. Rio de Janeiro: Medsi; 2001.

KOTAPATI S, KUTI JL, NIGHTINGALE CH. Clinical implications of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Klebsiella* species and *Escherichia coli* on cefepime effectiveness. J Infect 2005; 51(3): 211-217.

KÜMMERER K, AL-AHMAD A, MERSCH-SUNDERMANN V. Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test. Chemosphere 2000; 40(7): 701-710.

KÜMMERER K. Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources - a review. Chemosphere 2001; 45: 957-969.

KÜMMERER, K. Significance of antibiotics in the environment. J Antimicrob Chemother 2003; 52(1): 5-7.

KÜMMERER K, HENNINGER A. Promoting resistance by emission of antibiotics from hospitals and households into effluent. Clin Microbiol Infect 2003; 9(12): 1203-1214.

KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I. Chemosphere 2009; 75(4): 417-434.

KÜMMERER K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. Chemosphere 2009b; 75(4): 435-441.

LAPARA TM, FURL JS, ONAN LJ, GHOSH S, YAN T, SADOWSKY MJ. Municipal Wastewater Treatment: A Novel Opportunity to Slow the Proliferation of Antibiotic-Resistant Bacteria? Cura Reporter 2002; 145: 18-23.

LARSSON DG, DE PEDRO C, PAXEUS N. Effluent from drug manufactures contains extremely high levels of pharmaceuticals. J Hazard Mater 2007; 148(3): 751-755.

LEE K, CHONG Y, SHIN HB, KIM YA, YONG D, YUM JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- $\beta$ -lactamase producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. Clin Microbiol Infect 2001; 7(2): 88-91.

LEE H, YONG D, YUM JH, ROH KH, LEE K, YAMANE K, ARAKAWA Y, CHONG Y. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 56(3): 305-312.

LIBANIO PAC, CHERNICHARO CAL, NASCIMENTO NO. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. Eng Sanit Ambient 2005; 10(3): 219-228.

LINDBERG R, JARNHEIMER PA, OLSEN B, JOHANSSON M, TYSKLIND M. Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. Chemosphere 2004; 57(10): 1479-1488.

LINTON KB, RICHMOND MH, BEVAN R, GILLESPIE WA. Antibiotic resistance and R factors in coliform bacilli isolated from hospital and domestic sewage. J Med Microbiol 1974; 7: 91-103.

LIVERMORE DM. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. Scand J Infec Dis 1991; 78:7-16.

LIVERMORE DM.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8(4): 557-584.

LIVERMORE DM, WOODFORD N. The beta-lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol 2006; 14(9):413-420.

LOKE ML, INGERSLEV F, HALLING-SØRENSEN B, TJØRNELUND J. Stability of Tylosin A in manure containing test systems determined by high performance liquid chromatography. Chemosphere 2000; 40(7): 759-765.

LUDWIG KM, FREI F, ALVARES FILHO F, RIBEIRO-PAES JT. Correlação entre condições de saneamento básico e parasitoses intestinais na população de Assis, Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop 1999; 32(5): 547-555.

LUNA EJA. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. Rev Bras Epidemiol 2002; 5(3): 229-243.

LUZ MMAVRMR. Isolados clínicos de *Enterobacteriaceae*, da comunidade, produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro alargado. Porto; 2008. Mestrado [Dissertação em Análises Clínicas] - Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

MADIGAN MT, MARTINKO JM, PARKER J. Microbiologia de Brock. 10 ed. São Paulo: Pearson/Prentice Hall; 2004.

MARCONDES WB. A convergência de referências na promoção da saúde. Saúde Soc 2004; 13(1): 5-13.

MARTINEZ JL, BAQUERO F. Mutation Frequencies and Antibiotic resistance. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44(7): 1771-1777.

MEIRELLES-PEREIRA F, PEREIRA AMS, SILVA MCG, GONÇALVES VD, BRUM PR, CASTRO EAR, PEREIRA AA, PEREIRA JAA. Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz J Microbiol* 2002; 33(4): 287-293.

MENEZES EA, NASCIMENTO KM, SOARES KP, AMORIM LN, LIMA NETO JG, CUNHA FA. Avaliação da atividade *in vitro* do meropenem contra cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido na cidade de Fortaleza, Ceará. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40(3): 349-350.

MESA RJ, BLANC V, BLANC AR, CORTÉS P, GONZÁLEZ JJ, LAVILLA S, MIRÓ E, MUNIESA M, SACO M, TÓRTOLA MT, MIRELIS B, COLL P, LLAGOSTERA M, PRATS G, NAVARRO F. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* 2006; 58(1): 211-215.

MEZRIOUI N, BALEUX B. Resistance patterns of *E. coli* strains isolated from domestic sewage before and after treatment in both aerobic lagoon and activated sludge. *Water Res* 1994; 28(11): 2399-2406.

MINARINI LAR, GALES AC, PALAZZO ICV, DARINI ALC. Prevalence of community-occurring Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. *Curr Microbiol* 2007; 54(5): 335-341.

MONTEIRO J, SANTOS AF, ASENSI MD, PEIRANO G, GALES AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1): 333-334.

MORAES LRS. Conceitos de saúde e saneamento. Salvador: DHS/UFBA; 1993.

MUELA A, POCINO I, ARANA J, JUSTO JI, IRIBERRI J, BARCINA I. Effects of growth phase and parental cell survival in river water on plasmid transfer between *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60(12): 4273-4278.

MULVEY MR, SOULE G, BOYD D, DEMCZUK W, AHMED R, THE MULTI-PROVINCIAL *SALMONELLA TYPHIMURIUM* CASE CONTROL STUDY GROUP. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *J Clin Microbiol* 2003; 41(1): 460-462.

MURRAY GE, TOBIN RS, JUNKINS B, KUSHNER DJ. Effect of Chlorination on Antibiotic Resistance Profile of Sewage-Related Bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1984; 48(1): 73-77.

MURRAY PR, BARON EJ, JORGENSEN JH, PFALLER MA, YOLKEN RH. *Manual of Clinical Microbiology*. 8 ed. Washington: ASM Press; 2003.

NAAS T, CUZON G, VILLEGAS MV, LARTIGUE MF, QUINN JP, NORDMANN P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4): 1257-1263.

NASCIMENTO GGF, MAESTRO V, CAMPOS MSP. Ocorrência de resíduos de antibióticos no leite comercializado em Piracicaba, SP. *Rev Nutr* 2001; 14(2): 119-124.

NIEDERMAN MS. Impact of antibiotic resistance on clinical outcomes and the cost of care. *Crit Care Med* 2000; 29(4): N114–N120.

NISHIO H, KOMATSU M, SHIBATA N, SHIMAKAWA K, SUEYOSHI N, URA T, SATOH K, TOYOKAWA M, NAKAMURA T, WADA Y, ORITA T, KOFUKU T, YAMASAKI K, SAKAMOTO M, KINOSHITA S, AIHARA M, ARAKAWA Y. Metallo- $\beta$ -lactamase-producing gram-negative bacilli: laboratory based surveillance in cooperation with 13 clinical laboratories in the Kinki region of Japan. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5256-5263.

NORDMANN P, CUZON G, NAAS T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9(4): 228-236.

OLIVE MD, BEAN P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. J Clin Microbiol 1999; 37(6): 1661-1669.

OLIVEIRA SC, VON SPERLING M. Análise da confiabilidade de estações de tratamento de esgotos. Eng Sanit Ambient 2007; 12(4): 389-398.

OLIVEIRA CF, DAL FORNO NLF, ALVES IAA, HORTA JA, RIEGER A, ALVES SH. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. Rev Soc Bras Med Trop 2009; 42(5): 556-560.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Constitution of the world health organization basic documents. Genebra: WHO; 1946.

OMS. Organização Mundial de Saúde. La contención de la resistencia a los antimicrobianos. 2005. [Acesso em 19 out. 2010] Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO\\_PSM\\_2005.1\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2005/WHO_PSM_2005.1_spa.pdf).

OMS. Organização Mundial de Saúde. Contengamos la resistencia microbiana. [Acesso em 20 out. 2010] Disponível em: [http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO\\_CDS\\_2000.2\\_spa.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2000/WHO_CDS_2000.2_spa.pdf).

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Atenção Primária Ambiental. Washington, DC; 1999. [Acesso em 7 nov. 2010] Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/arquivos/apa.pdf>.

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. Infecção Hospitalar. 2000. [Acesso em 07 nov. 2010] Disponível em: <http://www.opas.org.br/sistema/fotos/hospitala1.PDF>.

ORTOLAN MGS, CARDOSO MRI, AYUB MAZ. Perfil microbiológico de bactérias mesofílicas do efluente do hospital de clínicas de Porto Alegre. In: XXVII Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental. Anais do 27º Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental; 3-8 dez. 2000; Porto Alegre, Brasil. ABES; 2000.

PANNUTI CS, GRIMBAUM RS. An overview of nosocomial infection control in Brazil. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1995; 16(3): 170-174.

PATERSON DL, BONOMO, RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(4): 657-686.

PEIRANO G, SEKI LM, PASSOS VLV, PINTO MCFG, GUERRA LR, ASENSI MD. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(2): 265-268.

PFALLER MA, SEGRETI J. Overview of the Epidemiological Profile and Laboratory Detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases. *Clin Infect Dis* 2006; 42(Suppl 4): S153-163.

PITOUT JDD, SAANDERS CC, SANDERS JR WE. Antimicrobial resistance with focus on  $\beta$ -lactam resistance in Gram-negative bacilli. *Am J Med* 1997; 103(1): 51-59.

PITOUT JD, HANSON ND, CHURCH DL, LAUPLAND KB. Population-Based Laboratory Surveillance for *Escherichia coli*-Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamses: Importance of Community Isolates with *bla*<sub>CTX-M</sub> Genes. *Clin Infect Dis* 2004; 38(12): 1736-1741.

PODSCHUN R, ULLMANN U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11(4): 589-603.

POURNARAS S, IKONOMIDIS A, SOFIANOU D, TSAKRIS A, MANIATIS AM. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases Affect Community *Escherichia coli* Treatment. *Emerg Infect Dis* 2004; 10(6): 1163-1164.

PRADO T, PEREIRA WC, SILVA DM, SEKI LM, CARVALHO APD'A, ASENSI MD. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol* 2008; 46(1): 136-141.

QUEENAN AM, BUSH K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3): 440-458.

RAHMAN M, HUYS G, KÜHN I, RAHMAN M, MÖLLBY R. Prevalence and transmission of antimicrobial resistance among *Aeromonas* populations from a duckweed aquaculture based hospital sewage water recycling system in Bangladesh. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2009; 96(3): 313-321.

REINTHALER FF, POSCH J, FEIERL G, WUST G, HASS D, RUCKENBAUER G, MASCHER F, MARTH E. Antibiotic Resistance of *E. coli* in Sewage and Sludge. *Water Res* 2003; 37(8): 1685-1690.

REINTHALER FF, FEIERL G, GALLE H, HAAS D, LEITNER E, MASCHER F, MELKES A, POSCH J, WINTER I, ZARFEL G, MARTH E. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* 2010; 44(6): 1981-1985.

RICHARDSON ML, BOWRON JM. The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment. *J Pharm Pharmacol* 1985; 37(1): 1-12.

RODRÍGUEZ-BAÑO J, NAVARRO MD, ROMERO L, MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L, MUNIAIN MA, PEREA EJ, PÉREZ-CANO R, PASCUAL A. Epidemiology and Clinical Features of Infections Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing *Escherichia coli* in Nonhospitalized Patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42(3): 1089-1094.

ROSÁRIO NA, GRUMACH AS. Alergia a beta-lactâmicos na clínica pediátrica: uma abordagem prática. *J Pediatr* 2006; 82(5): 181-188.

ROSSI F, ANDREAZZI DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o Antibiograma. São Paulo: Atheneu; 2005.

ROSSOLINI GM, D'ANDREA MM, MUGNAIOLI C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(1): 33-41.

SABATÉ M, TARRAGÓ R, NAVARRO F, MIRÓ E, VERGÉS C, BARBÉ J, PRATS G. Cloning and Sequence of the Gene Encoding a Novel Cefotaxime-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(7): 1970-1973.

SADER HS, SAMPAIO JLM, ZOCCOLI C, JONES RN. Results of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program results in three Brazilian medical centers for 1997. *Braz J Infect Dis* 1999; 3(2): 63-79.

SADER HS. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. *Braz J Infect Dis* 2000; 4(2): 91-99.

SADER HS, GALES AC, PFALLER MA, MENDES RE, ZOCCOLI C, BARTH A, JONES RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Braz J Infect Dis* 2001; 5(4): 200-215.

SAMAHA-KFOURY JN, ARAJ GF. Recent developments in  $\beta$ -lactamases and extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *BMJ* 2003; 327(7425): 1209-1213.

SANGUINETTI M, POSTERARO B, SPANU T, CICCAGLIONE D, ROMANO L, FRIORI B, NICOLETTI G, ZANETTI S, FADDA G. Characterization of Clinical Isolates *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Detection Method. *J Clin Microbiol* 2003; 41(4): 1463-1468.

SANTOS DF, PIMENTA FC, OLIVEIRA RA, MONTALVÃO ER, SANTOS DB, CARMO FILHO JR. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. *Braz J Microbiol* 2008; 39(4): 608-612.

SASAKI T, HIRAI I, NIKI M, NAKAMURA T, KOMALAMISRA C, MAIPANICH W, KUSOLSUK T, SA-NGUANKIAT S, PUBAMPEN S, YAMAMOTO Y. High prevalence of

CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(4): 666–668.

SCHMIDT AS, BRUUN MS, DALSGAARD I, LARSEN JL. Incidence, Distribution, and Spread of Tetracycline Resistance Determinants and Integron-Associated Antibiotic Resistance Genes among Motile Aeromonads from a Fish Farming Environment. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67(12): 5675–5682.

SCHWAB BW, HAYES EP, FIORI JM, MASTROCCO FJ, RODEN NM, CRAGIN D, MEYRHOF RD, DÀCO VJ, ANDERSON PD. Human pharmaceuticals in US surface waters: A human health risk assessment - A review. *Regul Toxicol Pharmacol* 2005; 42(3): 296-312.

SCHWARTZ DC, CANTOR CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 1984; 37(1): 67-75.

SCHWARTZ T, KOHNEN W, JANSEN B, OBST U. Detection of Antibiotic-Resistant Bacteria and their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water, and Drinking Water Biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; 43(3): 325-335.

SEBASTINE IM, WAKEMAN RJ. Consumption and Environmental Hazards of Pharmaceutical Substances in the UK. *Process Safety and Environmental Protection* 2003; 81(4): 229-235.

SENGUPTA N, ALAM SI, KUMAR RB, SINGH L. Diversity and antibiotic susceptibility pattern of cultivable anaerobic bacteria from soil and sewage samples of India. *Infect Genet Evol* 2011; 11(1): 64-77.

SMALLA K, HEUER H, GÖTZ A, NIEMEYER D, KRÖGERRECKLENFORT E, TIETZE E. Exogenous Isolation of Antibiotic Resistance Plasmids from Piggery Manure Slurries Reveals a High Prevalence and Diversity of IncQ-Like Plasmids. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66(11): 4854-4862.

SOARES SRA, BERNARDES RS, CORDEIRO NETTO OM. Relações entre Saneamento, Saúde Pública e Meio Ambiente: Elementos para Formulação de um Modelo de Planejamento em Saneamento. Cad Saúde Pública 2002; 18(6): 1713-1714.

SOBRINHO PA, JORDÃO EP. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios - uma análise crítica. [Acesso em 25 out. 2010] Disponível em: <http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap-9.pdf>.

SOGE OO, QUEENAN AM, OJO KK, ADENIYI BA, ROBERTS MC. CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. J Antimicrob Chemother 2006; 57(1): 24-30.

SOUZA CMN. Relação saneamento-saúde-ambiente: os discursos preventivista e da promoção da saúde. Saúde Soc 2007; 16(3): 125-137.

SOUZA HP, VILHORDO DW, BREIGEIRON R, ALESSANDRETTI MB, DOTTI E, SILVA TGB. Auditoria no uso de antimicrobianos em enfermaria cirúrgica. Rev Col Bras Cir 2008; 35(4): 216-220.

STÜRENBURG E, MACK D. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect 2003; 47(4): 273-295.

STURTEVANT JR AB, FEARY TW. Incidence of infectious drug resistance among lactose-fermenting bacteria isolated from raw and treated sewage. Appl Microbiol 1969; 18(5): 918-924, 1969.

TAKAYANAGUI AMM. Consciência ecológica e os resíduos de serviços de saúde. Rev Latino-Am Enfermagem 1993; 1(2): 93-96.

TAVARES W. Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfecciosos. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 1996.

TEIXEIRA JC, PUNGIRUM MEMC. Análise da associação entre saneamento e saúde nos países da América Latina e do Caribe, empregando dados secundários do banco de dados da Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS. Rev Bras Epidemiol 2005; 8(4): 365-376.

TENNSTEDT T, SZCZEPANOWSKI R, BRAUN S, PÜHLER A, SCHLÜTER A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. FEMS Microbiol Ecol 2003; 45(3): 239-252.

TENOVER FC, ARBEIT RD, GOERING RV, THE MOLECULAR TYPING WORKING GROUP OF THE SOCIETY FOR HEALTHCARE EPIDEMIOLOGY OF AMERICA. How to Select and Interpret Molecular Strain Typing Methods for Epidemiological Studies of Bacterial Infections: A Review for Healthcare Epidemiologist. Infect Control Hosp Epidemiol 1997; 18(6): 426-439.

TORTORA GJ, FUNKE BR, CASE CL. Microbiologia. 8 ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.

TOSIN I, SILBERT S, SADER HS. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among gram-negative rods in Brazilian hospitals. Braz J Infect Dis 2003; 7(6): 360-369.

TOZE S. PCR and detection of microbial pathogens in water and wastewater. Water Res 1999; 33(17): 3545-3556.

TRABULSI LR, ALTERTHUM F, GOMPERTZ OF, CANDEIAS JA. Microbiologia. 3 ed. São Paulo: Atheneu; 1999.

TSAKONA M, ANAGNOSTOPOULOU E, GIDARAKOS E. Hospital waste management and toxicity evaluation: A case study. Waste Manag 2007; 27(7): 912-920.

TZOC E, ARIAS ML, VALENTE C. Efecto de las aguas hospitalarias sobre los patrones de resistencia a antibióticos de *Escherichia coli* y *Aeromonas* sp. Rev Biomed 2004; 15(3): 165-172.

VECCHIA AD, THEWES MR, HARB NAIME R, SPILKI FR. Diagnóstico sobre a situação do tratamento de esgoto hospitalar no Brasil. *Revista Saúde e Ambiente* 2009; 10(2): 65-69.

VERONESI R, FOCACCIA R. *Tratado de Infectologia*. 2 ed. São Paulo: Atheneu; 2004.

VILANOVA X, MANERO A, CERDÀ-CUELLAR M, BLANCH AR. The composition and persistence of faecal coliforms and enterococcal populations in sewage treatment plants. *J Appl Microbiol* 2004; 96(2): 279-288.

VON SPERLING M. *Introdução à Qualidade das Águas e ao Tratamento de Esgotos*. 3 ed. Belo Horizonte: DESA/ UFMG; 2005.

VON SPERLING M, VAN HAANDEL AC, JORDÃO EP, CAMPOS JR, CYBIS LF, AISSE MM, SOBRINHO PA. Pós-tratamento de efluentes de reatores anaeróbios por lodos ativados. [Acesso em 25 out. 2010] Disponível em: <http://www.finep.gov.br/prosab/livros/ProsabCarlos/Cap-5.pdf>.

WATKINSON AJ, MURBY EJ, COSTANZO SD. Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: implications for environmental discharge and wastewater recycling. *Water Res* 2007; 41(18): 4164-4176.

WATKINSON AJ, MURBY EJ, KOLPIN DW, COSTANZO SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci Total Environ* 2009; 407(8): 2711-2723.

WEN X, DING H, HUANG X, LIU R. Treatment of hospital wastewater using a submerged membrane bioreactor. *Process Biochemistry* 2004; 39(11): 1427-1431.

WILLIAMS JD.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Inter J Antimicrob Agents* 1999; 12(Suppl. 1): 3-7.

WISE R. Antimicrobial resistance: priorities for action. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(4): 585-586.

WRIGHT GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol* 2007; 5:175-186.

WOOD DW, PIERSON LS. The *phzI* gene of *Pseudomonas aureofaciens* 30-84 is responsible for the production of a diffusible signal required for phenazine antibiotic production. *Gene* 1996; 168(1): 49-53.

WOODFORD N, CARATTOLI A, KARISIK E, UNDERWOOD A, ELLINGTON MJ, LIVERMORE DM. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(10): 4472-4482.

YANG CM, LIN MF, LIAO PC, YEH HW, CHANG BV, TANG TK, CHENG C, SUNG C H, LIOU ML. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. *Lett Appl Microbiol* 2009; 48(5): 560-565.

YGITI H, QUEENAN AM, ANDERSON GJ, DOMENECH-SANCHEZ A, BIDDLE JW, STEWARD CD, ALBERTI S, BUSH K, TENOVER FC. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(4): 1151-1161.

ZUCCATO E, CALAMARI D, NATANGELO M, FANELLI R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000; 355(9217): 1789-1790.

## **ANEXOS**

## ANEXO A- Trabalho submetido para publicação

Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil

T.P.G. Chagas<sup>1</sup>, L.M. Seki<sup>1</sup>, J.C. Cury<sup>2</sup>, J.A.L. Oliveira<sup>2</sup>, A.M.R. Dávila<sup>2</sup>, D.M. Silva<sup>3</sup> and M.D. Asensi<sup>1</sup>

1 Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

2 Laboratório de Biologia Computacional e Sistemas, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

3 Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

### Correspondence

Marise D. Asensi, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brasil.

E-mail: marise@ioc.fiocruz.br

Running headline: Resistant bacteria in hospital sewage

### Abstract

**Aims:** To investigate the bacterial diversity, antimicrobial-resistance patterns and types of beta-lactamases genes in Gram-negative bacteria isolated from a hospital sewage treatment plant.

**Methods and Results:** Samples from influent, clarifier tank effluent and chlorine contact tank effluent were collected in the period from July to December 2008 from a sewage treatment plant service of a hospital located in the city of Rio de Janeiro, Brazil. A total of 221 isolates were identified, among which 40% were characterized as extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producers. Non-pathogenic microorganisms and some pathogenic genus were quantified. The most common ESBL-producing isolates were: *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, and *Escherichia coli*. The *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were detected in 82%, 48% and 67% of bacterial isolates respectively.

**Conclusions:** The hospital wastewater treatment plant did not remove all antibiotic resistant microorganisms. It is suggested that hospital effluent may be considered as environmental vehicle of multiresistant microorganisms.

**Significance and Impact of the Study:** This study alerts for the evidence that resistant bacteria to multiple antibiotic and their resistance genes usually present in the hospital can reach the environment, even after the use of hospital wastewater treatment plants.

**Keywords:** Hospital Wastewater, Bacterial Diversity, Multiresistance, ESBL, Brazil

## Introduction

Antimicrobial drugs and antimicrobial-resistant bacteria are discharged in large quantities in the environment (Halling-Sorensen *et al.* 1998). Antimicrobial-resistant bacteria and antimicrobial-resistant genes (ARG) have been detected in different environments, such as domestic sewage, hospital sewage, sewage-contaminated river waters (Tennstedt *et al.* 2003; Reinthaler *et al.* 2003; Costanzo *et al.* 2005; Arikan and Aygan 2009; Reinthaler *et al.* 2010; Galvin *et al.* 2010). However, it is important to note that despite of human activity or level of water pollution, ARG also may be found in native and non native bacteria selected by low levels of antibiotics present in soil and water (Pruden *et al.* 2006; Storteboom *et al.* 2010).

Hospital waste and domestic sewage are a special category of waste, which are highly hazardous due to its infectious and toxic characteristics (Tsakona *et al.* 2007). Considering the healthcare centres, including hospitals, there is a constant generation of wastewater and consequent discharge of effluents which require an appropriate treatment and destination. Hospital sewage releases a variety of multiresistant bacteria and substances such as antimicrobials, pharmaceuticals, disinfectants, anesthetics, radioisotopes, heavy metals and drugs not metabolized by patients (Meirelles-Pereira *et al.* 2002; Emmanuel *et al.* 2005; Baquero *et al.* 2008).

Beta-lactam antibiotics are one of the most antibiotics used to treat hospitalized patient infected by gram-negatives bacteria. The production of beta-lactamases is the principal mechanism involved to inactivate these antibiotics. Class of Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) confers resistance to the penicillins, third-generation cephalosporins and aztreonam. The most abundant ESBL types are represented by SHV, TEM and CTX-M. (Paterson and Bonomo 2005).

In Brazil, few studies were done to compare the antimicrobial resistance patterns of bacteria in hospital sewage plants. In addition, the bacterial diversity in wastewater is largely unknown. The aim of this study was to determine the bacterial using metagenomic approach and display the antimicrobial-resistance profile and types of beta-lactamases (TEM, SHV and CTX-M) in Gram-negative bacteria isolated from a hospital sewage treatment plant in Rio de Janeiro city, Brazil.

## Materials and methods

### Wastewater Sampling and Characterization of the sewage treatment plant

We collect wastewater samples from a sewage treatment plant serve a hospital located in the metropolitan area of the Rio de Janeiro city (RJ), Brazil. The wastewater comes from the hospital's units, including laboratories, rehabilitation, dialysis, hospitalization, and surgery units, clinics, maternity, laundry and the cafeteria.

The hospital sewage treatment plant uses an extended aeration activated sludge process with a hydraulic retention time of 18h, sludge age of 20 days, operating temperatures of 18-25°C and mean influent flow of 5.0 Ls<sup>-1</sup>, followed by post-treatment (disinfection of final effluent by chlorination). An extended aeration activated sludge plant is a biological process by which non-settleable substances occurring in dissolved and colloidal forms are converted into settleable sludge. The plant is divided into three parts, an aeration tank (continuous stirred tank reactor with sludge recycle), a clarifier tank and a chlorine contact tank. In the pretreatment stage, the plant has a screen for gross solids removal.

Sampling was performed eight times between July and December 2008. Three samples (1000 mL) were collected on each day from an influent (raw sewage), a clarifier tank and a chlorine contact tank. Samples were collected by submerging sterile bottles in the different tanks. After collection, all samples were transported to the laboratory refrigerated for immediate analysis.

### Determination of environmental parameters

The physicochemical parameters pH, BOD<sub>5</sub> (biochemical oxygen demand over 5 days), COD (chemical oxygen demand), nitrogen as nitrate (N-NO<sub>3</sub>) and as ammonium (N-NH<sub>3</sub>) were determined.

The pH was determined by pH-meter Digimed DM20 (Digimed Instrumentação Analítica, Brazil). The COD test was performed according the closed reflux method followed by photometric determination. It was used a COD Reactor and visible spectrophotometer DR-2500 (Hach Company, USA). The BOD<sub>5</sub>, nitrate and ammonium were determined by using the potentiometric method with selective electrode Orion 081010MD, Orion 9707BNWP, Orion 9512HPBNWP respectively (Hach Company, USA).

Total and faecal coliforms were analysed by Colilert P/A Quanti tray 2000 Kit (IDEXX Laboratories, Westbrook, EUA) according to manufacturer's instructions and results

expressed by Most Number Probable (MNP) 100mL<sup>-1</sup>. The methodology used to assess the physicochemical parameters, total and faecal coliforms were consistent with the methods described in the Standard Methods for Examination of Water and Wastewater (APHA 1998).

#### Bacterial diversity determination by partial sequencing of 16S rDNA

Three samples (1000 mL) were collected on the same day from: influent (raw sewage), a clarifier tank and a chlorine contact tank. Effluents samples was filtered onto a 47 mm diameter 0.22-µm-nitrocellulose filter (Millipore) and stored at -80°C for later DNA extraction. DNA was extracted using UltraClean Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, CA) according to the manufacturer's protocol. The metagenomic 16S rDNA gene was amplified by PCR using the primer pair PRBA63f (Marchesi *et al.* 1998) and UN518r (Øvreås *et al.* 1997) for the domain bacteria. Agarose gel electrophoresis of 150 µl of PCR product was performed prior to purification with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Purified amplicons were cloned using pGEM-T Easy Vector (Promega) according manufacturer's protocol, and then transformed into competent DH5-alpha *Escherichia coli* cells. Ampicillin- and X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside)-amended LB agar was used for blue-white screening of transformants, which were subject to whole-cell PCR directly to amplify the plasmid insert. Each insert was sequenced using the BigDye terminator system and an ABI-3730 automatic capillary sequencer (Applied Biosystems).

The electropherogram sequencing files were processed using the Phred program (Ewing and Green 1988) for base calling and for trimming of vector and low quality (< 20) sequences. The high quality sequences located between the rRNA primers were used for further analysis.

The sequences were chimera-checked using the Mallard program (Ashelford *et al.* 2006), and the putative chimeras were excluded from further analysis. Valid sequences were then aligned using ClustalX 1.81 (Thompson *et al.* 1997). The PHYLIP format output alignments were used to construct distance matrices within each library using DNADIST provided in the PHYLIP 3.6 package (Felsenstein 1993), with default parameters and using the Jukes-Cantor model option. The generated matrices were used as input files for DOTUR (Schloss and Handelsman 2005) to calculate the species richness using Chao1 (Chao 1987) and ACE (Chao and Lee 1992) estimators, the rarefaction curves and the Shannon-Weaver diversity index (Shannon and Weaver 1949). The Good's coverage estimator was used to calculate the sample coverage using the formula  $C=1-(ni/N) \times 100$ , where N= total number of

sequences analysed and  $n_i$  = number of reads that occurred only once among the total number of reads analysed using DOTUR<sub>0.03</sub> (Good 1953; Good and Toulmin 1956).

The Bacteria phyla composition were determined by taxonomic assignment using the RDP Classifier (Wang *et al.* 2007) with default parameters through the web service provided by RDP II (Cole *et al.* 2008). For tree construction, the nearest neighbours of the 16S rRNA were obtained using the ALIGN tool (DeSantis *et al.* 2006). All the sequences were aligned with the ClustalW aligner (Thompson *et al.* 1994) of the MEGA4.0 program (Tamura *et al.* 2007). It were used the neighbour-joining method, the Jukes-Cantor model (Jukes and Cantor 1969) option and a bootstrap value of 1000.

#### Identification of wastewater isolates

A volume of 100 µl from each sample was inoculated onto the culture media. In order to optimize the bacterial count, a decimal dilution series ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  and  $10^{-3}$ ) with saline solution (NaCl) was prepared and 10 µl of the well homogenized solutions were plated in culture media. The plates were incubated at 37°C for 24 h after inoculation. The culture media used were Tergitol-7 (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) agar with TTC (0.05% triphenyltetrazolium chloride), GSP (Glutamate Starch Phenol Red agar) and EMB (Eosin Methylene Blue agar) (Oxoid).

Different colonies suggesting Gram-negative bacteria strains were identified based on the following biochemical tests: oxidase test, production of acids from glucose, lactose or sucrose, SIM agar (sulfate / indole / motility) and citrate agar. Further biochemical testing to identify the species was performed as per the guidelines in the Manual of Clinical Microbiology (Murray *et al.* 2003).

#### Antimicrobial susceptibility testing

The antimicrobial susceptibility of bacterial isolates was determined using the agar diffusion method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI 2009). The following antimicrobial discs (Oxoid) were used: amikacin (30µg), cefalothin (30 µg), trimethoprim-sulphamethoxazole (25µg), piperacillin/tazobactam (110µg), meropenem (10µg), ciprofloxacin (5µg), ceftazidime (30µg), imipenem (10µg), cefotaxime (30µg), cefepime (30µg) and ceftazidime (30µg). A Muller-Hinton plate was swabbed with TSB inoculated with each isolate with the turbidity of 0.5 McFarland standard. The antimicrobial agent discs were put on the inoculated plates and were then incubated at 35°C for 18-24 h. Inhibition zone

diameters in millimetres were measured using a ruler. The breakpoints used to categorize isolates as resistant or susceptible for each antimicrobial agent followed the CLSI guidelines. For quality control, the ATCC standard strains *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27953) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) were used.

Isolates were screened for the ESBL-producing phenotype by the standard double-disc synergy test, as described previously (Jarlier *et al.* 1988). The turbidity of the suspensions used for sensitivity testing was adjusted to 0.5 McFarland standards and inoculated onto Mueller-Hinton agar medium. The following antimicrobial discs (Oxoid) were used: amoxicillin/clavulanate (30/10 µg), cefotaxime (30µg), cefepime (30µg), ceftazidime (30µg) and aztreonam (30µg). ESBL production was considered positive when an enhanced zone of inhibition was visible between the beta-lactam- and beta-lactamase inhibitor-containing disks. For quality control, the standard *Klebsiella pneumoniae* strain (ATCC 700603) was used.

#### Characterization of beta-lactamase-encoding genes

Genetic detection was performed using PCR with bacterial DNA, which was extracted from the isolates by boiling the bacterial suspensions. A solution with a 1 µL extracted DNA was used as a template for PCR analysis. Screening for resistance genes was performed using *Taq* polymerase with previously reported conditions for detection of *bla*<sub>TEM</sub> (Hasman *et al.* 2005), *bla*<sub>SHV</sub> (Hasman *et al.* 2005) and *bla*<sub>CTX-M</sub> (Mulvey *et al.* 2003). An attempt to detect beta-lactamases was performed using primers TEM-F (5'GCGGAACCCCTATTTG 3'), TEM-R (5'ACCAATGCTTAATCAGTGAG 3'), SHV-F (5'-TTATCTCCCTGTTAGCCACC-3'), SHV-R (5'-GATTTGCTGATTTGCTCGG-3'), CTX-M-F (5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3') and CTX-M-R (5'-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG-3'). Gel electrophoresis was used for the analysis and the PCR products were visualized by 1.5% agarose gel and staining with ethidium bromide.

#### Statistical analysis

Data entry and analyses were performed using the Epi Info software version 3.5.1. (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, EUA). Comparison about the ratios of antimicrobial resistance between influent, clarifier tank effluent and chlorine contact tank

effluent was done by chi-square or Fisher's exact test as appropriate. Differences were considered significant if  $p < 0.05$ .

## Results

### Environmental parameters

Table 1 displays the means values of pH, BOD<sub>5</sub>, COD, nitrate and ammonium (N-NH<sub>3</sub>) in the sewage treatment plant. In addition, concentrations of total and faecal coliforms are shown.

### Bacterial diversity

A total 646 16S rRNA gene sequence were obtained, 334 from the influent and 312 from treated effluent, by the method used. The 16S rRNA sequences were analyzed by constructing species accumulation curves and calculating diversity indices. Different groups belonging to the domain Bacteria (*Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Spirochates*) were identified. Taxonomic similarities and phylogenetic relationships of common bacteria identified in both influent and treated effluent showed that the most bacteria belonged to the *Proteobacteria*. A main phylogenetic tree, constructed containing the overall metagenomic clone sequences obtained (not show), indicate that 38 clones retrieved from the treated effluent may belong to pathogenic bacteria. A smaller tree containing only these sequences was constructed. These clones that match with sequences belonged to potential pathogenic bacteria like as *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Shigella*, *Klebsiella* and *Stenotrophomonas* can be found in the phylogram (Figure 1) with their nearest neighbors.

### Antimicrobial susceptibility

A total of 221 Gram-negative bacteria were isolated and identified using established biochemical procedures (Table 2) and the antimicrobial resistance patterns of these can be found in Table 3. Among 221 isolates was observed a single, double and multiple resistance phenotypes. The prevalence of resistance to antimicrobial agents ranged from 0% to 83% in wastewater isolates and the majority of the strains were susceptible to imipenem and meropenem. Among the non-beta-lactam antibiotics, microorganisms isolated showed a higher antimicrobial resistance rates to amikacin and trimethoprim-sulphamethoxazole. In the beta-lactam group, the highest resistance rate was found for cefalothin. Considering the

presence of antimicrobial resistance in the different samples (influent, clarifier tank effluent and chlorine contact tank effluent), the chlorine contact tank effluent showed a significantly higher antimicrobial resistance rates to amikacin ( $p < 0.05$ ) and ceftazidime ( $p < 0.05$ ).

Bacterial isolates were screened for the ESBL phenotype and 44% of bacteria isolated were characterized as ESBL producers. The distribution of the ESBL-producing isolates from influent, clarifier tank effluent and chlorine contact tank effluent were 41/106 (38%), 36/79 (44%) and 20/36 (56%) respectively. The most common ESBL-producing isolates were *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* in wastewater samples and only one *Aeromonas* sp. isolate was ESBL-producing characterized (Table 4). All ESBL-producing isolates showed a multiresistance phenotype.

### Molecular Analysis

The *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes were detected in 82%, 48% and 67% of ESBL-producing isolates respectively. Seventy-three of isolates found accumulated other beta-lactam resistance enzymes (Table 5). The association of types TEM and CTX-M was more frequent.

### Discussion

Pathogenic and resistant microorganisms were detected in the wastewater treatment plant studied, representing a potential risk for microbiological pollution of water resources. This point should be considered in the use of similar plants. In Brazil, the hospital wastewater treatment process problem is severe than in most countries, considering which only 3/127 (2.4%) of Brazilian hospitals have wastewater treatment plants (Oliveira *et al.* 2007). Previous study showed that few plants, such as extended aeration activated sewage plant, not would be able to present reliable performances in terms of the compliance of effluent BOD, COD and coliforms to discharge (Vecchia *et al.* 2009).

Regarding physicochemical parameters it was demonstrated that concentrations of COD and BOD<sub>5</sub> found during the stages of sewage treatment processes were lower when compared to data observed in previous studies (Rezaee *et al.* 2005; Emmanuel *et al.* 2005). The wastewater comes from the hospital's units, including restaurants, laundry and the cafeteria seem to affect the concentrations of BOD<sub>5</sub> and COD. With regard to nitrate, the values are high for a municipal and hospital wastewater. Certain quaternary ammonium

compounds used as antimicrobials and disinfectants are discharged in wastewater treatment plant and possibly seem to affect concentrations of nitrate and the systems performance.

Results on the microbiological characterization of hospital wastewater reported these effluents have bacteria concentrations lower than  $10^8$   $100\text{mL}^{-1}$  generally present in the domestic sewage system. The low most probable number detected for total and fecal bacteria in hospital is probably due to the presence of disinfectants and antibiotics (Emmanuel *et al.* 2005). Results of previous studies on the hospital wastewater reported coliforms concentrations in the order  $10^2$  to  $10^7$   $100\text{mL}^{-1}$  (Gallert *et al.* 2005; Reinthaler *et al.* 2010; Galvin *et al.* 2010).

In designing this study, we sought to sample multiple samples over a number of months, for the specific purposes of identifying the predominant species and possible trends in terms of microbial resistance.

The increasing popularity of PCR-based culture-independent methods to the study of microbial communities is based on the premise that they will help to reveal the nature of the 99% of the bacterial community which cannot be cultured on bacteriological media. Given that it would have been impractical to use all the different culture media to identify the bacteria diversity present in the water we decided to apply a molecular culture independent method. However, we believe it is possible that our culture-based assessment may have underestimated species diversity.

In this study, was confirmed the predominance of some of the species identified via culture, and identified others which were either undetected or underestimated. A minority of the species detected by culture were also detected by the cloning method, such as *Aeromonas* and *Klebsiella*, indicating the limitations of each method. The species *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp, *Escherichia* spp, *K. ornithinolytica*, *K. oxytoca* , *K. terrigena*, *Pantoea agglomerans*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* and *S. rubidaceae* were presented in the culture media but were not detected by molecular approach. In the opposite *K. varriicola* was identified by the cloning technique but not by culturable methods.

Most of the studies pertaining to antibiotic resistance profile of pathogenic microbes are directed towards clinical isolates and there are very few such reports for environmental strains of bacteria. Among the antimicrobials evaluated, the carbapenemics (imipenem and meropenem) are the most powerful antibiotics in the antimicrobial susceptibility testing. Carbapenems such as imipenem and meropenem are recommended as therapy for severe infections caused by ESBL-producing bacteria.

Resistant bacteria were also observed in chlorine contact tank effluent. Murray *et al.* (1984) detected a significant increase in the percentage of strains multiply resistant to two or three antibiotics when influent was chlorinated in the laboratory and a marginal increase when influent was compared with effluent which had been treated at the sewage treatment plant. Previous study indicates the possibility that chlorination might result in the alteration of wastewater populations, with the selection of chlorine-resistant bacteria, which might contribute to selection of particular resistance genes (Macauley *et al.* 2006).

The occurrence of multiresistant and ESBL-producing bacteria in hospitals effluents was described in this study. Prado *et al.* (2008) detected previously the presence of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (20/43) in the effluent and sludge of hospital sewage plants from Rio de Janeiro, Brazil. One of the recurring concerns because of the presence of ESBL-producing bacteria in these environments is associated with the transfer of conjugative plasmids, which also carry genes of resistance to other antimicrobial agents, giving the bacteria multiresistance patterns (Heuer *et al.* 2002; Paterson 2006).

The incidence of ESBL-producing bacteria is increasing globally. ESBLs have been found in 30 to 60% of *Klebsiella* from intensive care units in Brazil, Colombia, and Venezuela. However, in recent years there has been a wide variety of reports of true community-acquired infections with ESBL-producing organisms (Mesa *et al.* 2006; Sasaki *et al.* 2010). The prevalence of ESBL varies according to different regions or to different hospitals, however, *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* are commonly found related to these enzymes (Freitas *et al.* 2003).

Among the beta-lactamase-encoding genes studied, *bla*<sub>TEM</sub> was characterised in majority of ESBL-producing isolates and is associated with TEM-type ESBL. This enzyme group and SHV beta-lactamases have been known as an ESBL-producing group of beta-lactamases for a long time (Oliveira *et al.* 2009). However, CTX-M beta-lactamases have only increased in significance in recent years (Eisner *et al.* 2006). Many of the isolates harboured other beta-lactam resistance enzymes and the association of types TEM and CTX-M was more frequent. Previous studies have shown that ESBL mediating plasmids may carry more than one beta-lactamase gene and that they may be responsible for high-level beta-lactamase resistance phenotypes (Kiratisin *et al.* 2008). The beta-lactamases genes in hospital wastewater microorganisms could have opportunity for environmental dissemination and possibly human exposure and transmission, although direct links have not been shown.

In conclusion, it was demonstrated in this study that the hospital wastewater treatment plant did not show a satisfactory efficacy in removing resistant microorganisms. It is suggested that the incorrect handling and disposal of the hospital effluents into inappropriate locations may facilitate dissemination of microorganisms and resistance genes. Also it should be remembered that many hospitals in developing countries do not have wastewater treatment facilities. Quick measures are necessary with the intention of minimizing the impact from the release of hospital wastewaters into water resources.

#### Acknowledgments

We acknowledge funding from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto Oswaldo Cruz.

#### References

- APHA. (1998) *Standard Methods for the Examination Water and Wastewater*, 20th ed. Washington, DC: American Public Health Association.
- Arikan, B. and Aygan, A. (2009) Resistance Variations of Third Generation of Cephalosporins in Some of the *Enterobacteriaceae* Members in Hospital Sewage. *Int J Agric Biol* **11**, 93-96.
- Baquero, F., Martínez, J.L. and Cantón, R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr Opin Biotechnol* **19**, 260-265.
- Chao, A. (1987) Estimating the population size for capture-recapture data with unequal catchability. *Biometrics* **43**, 783-791.
- Chao, A. and Lee, S.M. (1992) Estimating the number of classes via sample coverage. *J Am Statist Assoc* **87**, 210-217.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2009) *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. CLSI/NCCLS M100-S19. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B. et al. (2008) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* **37**, D141-145.
- Costanzo, S.D., Murby, J. and Bates, J. (2005) Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environmental. *Mar Pollut Bull* **51**, 218-223.
- DeSantis, T. Z. P., Hugenholtz, K., Keller, E. L., Brodie, N., Larsen, Y. M., Piceno, R. Phan, and G. L. Andersen. (2006). NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* **34**, W394-399.
- Eisner, A., Fagan, E.J., Feierl, G., Kessler, H.H., Marth, E., Livermore, D.M. and Woodford, N. (2006) Emergence of *Enterobacteriaceae* isolates producing CTX-M extended spectrum beta-lactamase in Austria. *Antimicrob Agents Chemother* **50**, 785-787.
- Emmanuel, E., Perrodin, Y., Keck, G., Blanchard, J.M. and Vermande, P. (2005) Ecotoxicological risk assessment of hospital wastewater: a proposed framework for raw effluents discharging into urban sewer network. *J Hazard Mater* **A117**, 1-11.

- Ewing, B. and Green, P. (1988) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II error probabilities. *Genome Res* **8**, 186-194.
- Felsenstein, J.P. (1993) Phylogenetic inference package version 3.5c. Distributed by the author, Department of Genetics, Univ. Washington, Seattle.
- Freitas, A.L.P., Machado, D.P., Soares, F.S.C. and Barth, A.L. (2003) Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* Obtained in a Brazilian Teaching Hospital: Detection, Prevalence and Molecular Typing. *Braz J Microbiol* **34**, 344-348.
- Gallert, C., Fund, K. and Winter, J. (2005) Antibiotic resistance of bacteria in raw and biologically treated sewage and in groundwater below leaking sewers. *Appl Microbiol Biotechnol* **69**, 106-112.
- Galvin, S., Boyle, F., Hickey, P., Vellinga, A., Morris, D. and Martin Cormican, M. (2010) Enumeration and Characterization of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Bacteria in Effluent from Municipal, Hospital, and Secondary Treatment Facility Sources. *Appl Environ Microbiol* **76**, 4772-4779.
- Good, I.J. (1953) The population frequencies of species and the estimation of the population parameters. *Biometrika* **40**, 237-264.
- Good, I.J. and Toulmin, G. (1956) The number of new species and the increase of population coverage when a sample is increased. *Biometrika* **43**, 45-63.
- Halling-Sorensen, B., Nors Nielsen, S., Lanzky, P.F., Ingerslev, F., Holten Lützhøft, H.C. and Jørgensen, S.E. (1998) Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment – a review. *Chemosphere* **36**, 357-393.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I. and Aarestrup, F.M. (2005)  $\beta$ -lactamases among extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother* **56**, 115-121.
- Heuer, H., Krögerrecklenfort, E., Wellington, E.M.H., Egan, S., van Elsas, J.D., van Overbeek, L., Collard, J.M., Guillaume, G., Karagouni, A.D., Nikolakopoulou, T.L. and Smalla, K. (2002) Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 289-302.
- Jarlier, V., Nicolas, M.H., Fournier, G. and Philippon, A. (1988) Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* **10**, 867-878.
- Jukes, T.H. and Cantor, C.R. (1969) Evolution of protein molecules. In: Munro HN. Editors. *Mammalian protein metabolism*, New York: Academic, 21-132.
- Kiratisin, P., Apisarnthanarak, A., Laesripa, C. and Saifon, P. (2008) Molecular characterization and epidemiology of extended spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 2818-2824.
- Macauley, J.J., Quiang, Z., Adams, C.D., Surampalli, R. and Mormile, M.R. (2006) Disinfection of swine wastewater using chlorine, ultraviolet light and ozone. *Water Res* **10**, 2017-2026.
- Marchesi, J.R., Takuichi, S., Weightman, A.J., Martin, T.A., Fry, J.C., Hiom, S.J. and Wade, W.G. (1998) Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **64**, 795-799.
- Meirelles-Pereira, F., Pereira, A.M.S., Silva, M.C.G., Gonçalves, V.D., Brum, P.R., Castro, E.A.R., Pereira, A.A. and Pereira, J.A.A. (2002) Ecological aspects of the antimicrobial resistance in bacteria of importance to human infections. *Braz J Microbiol* **33**, 287-293.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanc, A.R., Cortés, P., González, J.J., Lavilla, S., Miró, L., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G. and Navarro, F. (2006) Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in different

- environments (humans, food, animal farms and sewage). *J Antimicrob Chemother* **58**, 211–215.
- Mulvey, M.R., Soule, G., Boyd, D., Demczuk, W., Ahmed, R. and the Multi-provincial *Salmonella Typhimurium* case control study group. (2003) Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *J Clin Microbiol* **41**, 460-462.
- Murray, G.E., Tobin, R.S., Junkins, B. and Kushner, D.J. (1984) Effect of chlorination on antibiotic resistance profiles of sewage-related bacteria. *Appl Environ Microbiol* **48**, 73-77.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Tenover, M.A. and Tenover, R.H. (2003) *Manual of Clinical Microbiology*, 8th ed. Washington, DC: ASM Press.
- Oliveira, S.C. and von Sperling, M. (2007) Análise da confiabilidade de estações de tratamento de esgotos. *Eng Sanit Ambient* **12**, 389-398.
- Oliveira, C.F., dal Forno, N.L.F., Alves, I.A.A., Horta, J.A., Rieger, A. and Alves, S.H. (2009) Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop* **42**, 556-560.
- Øvreås, L., Forney, L., Daae, F.L. and Torsvik, V. (1997) Distribution of bacterioplankton in meromictic lake saelevannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* **63**, 3367-3373.
- Paterson, D.L. and Bonomo, R.A. (2005) Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev* **18**, 657-686.
- Paterson, D.L. (2006) Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med* **119**, S20–S28.
- Prado, T., Pereira, W.C., Silva, D.M., Seki, L.M., Carvalho, A.P.D'.A. and Asensi, M.D. (2008) Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol* **46**, 136-141.
- Pruden, A., Pei, R., Storteboom, H. and Carlson, K.H. (2006) Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environ Sci Technol* **40**, 7445-50.
- Reinthal, F.F., Posch, J., Feierl, G., Wust, G., Hass, D., Ruckenbauer, G., Mascher, F. and Marth, E. (2003) Antibiotic resistance of *E. coli* in sewage and sludge. *Water Res* **37**, 1685–1690.
- Reinthal, F.F., Feierl, G., Galle, H., Haas, D., Leitner, E., Mascher, F., Melkes, A., Posch, J., Winter, I., Zarfel, G. and Marth, E. (2010) ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* **44**, 1981-1985.
- Rezaee, A., Ansari, M., Khavanin, A., Sabzali, A. and Aryan, M.M. (2005) Hospital wastewater treatment using an integrated anaerobic aerobic fixed film bioreactor. *Am J Environ Sci* **1**, 259-263.
- Sasaki, T., Hirai, I., Niki, M., Nakamura, T., Komalamisra, C., Maipanich, W., Kusolsuk, T., Sa-nguankiat, S., Pubampen, S. and Yamamoto, Y. (2010) High prevalence of CTX-M  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in stool specimens obtained from healthy individuals in Thailand. *J Antimicrob Chemother* **65**, 666–668.
- Schloss, P.D. and Handersman, J. (2005) Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. *Appl Environ Microbiol* **71**, 1501-1506.
- Shannon, C.E. and Weaver, W. (1949) *The mathematical theory of information*. University of Illinois Press, Chicago.
- Storteboom, H., Arabi, M., Davis, J.G., Crimi, B. and Pruden, A. (2010) Tracking Antibiotic Resistance Genes in the South Platte River Basin Using Molecular Signatures of Urban, Agricultural, And Pristine Sources. *Environ Sci Technol* **44**, 7397-7404.

- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. (2007) MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* **24**, 1596-1599.
- Tennstedt, T., Szczepanowski, R., Braun, S., Pühler, A. and Schlüter, A. (2003) Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* **45**, 239–252.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* **22**, 4673-4680.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* **25**, 4876-4882.
- Tsakona, M., Anagnostopoulou, E. and Gidarakos, E. (2007) Hospital waste management and toxicity evaluation: A case study. *Waste Manag* **27**, 912–920.
- Vecchia, A.D., Thewes, M.R., Harb Naime, R. and Spilki, F.R. (2009) Diagnóstico sobre a situação do tratamento de esgoto hospitalar no Brasil. *Rev Saúde Amb* **10**, 65-69.
- Wang, Q, Garrity, G.M., Tiedje, J.M. and Cole, J.R. (2007) Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of RNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microb* **73**, 5261-5267.

Table 1 Mean environmental parameters obtained from the hospital wastewater

Parameters	Influent/SD	Clarifier tank effluent/SD	Chlorine contact tank effluent/SD
BOD <sub>5</sub> (mg L <sup>-1</sup> )	100.0 / 19.0	19.4 / 5.9	10.7 / 6.2
COD (mg L <sup>-1</sup> )	379.9 / 163.0	64.7 / 16.7	73.2 / 27.4
Ammonium (mg L <sup>-1</sup> )	11.1 / 2.0	6.0 / 5.9	4.4 / 5.7
Nitrate (mg L <sup>-1</sup> )	1198.0 / 1200.1	220.6 / 384.9	104.4 / 128.1
pH	7.5 / 0.8	6.6 / 0.5	6.7 / 0.5
Total coliforms (MPN 100mL <sup>-1</sup> )	7.3 x 10 <sup>5</sup> / 3.5 x 10 <sup>5</sup>	2.0 x 10 <sup>5</sup> / 2.4 x 10 <sup>5</sup>	0.3 x 10 <sup>5</sup> / 0.4 x 10 <sup>5</sup>
Faecal coliforms (MPN 100mL <sup>-1</sup> )	0.7 x 10 <sup>5</sup> / 1.0 x 10 <sup>5</sup>	0.2 x 10 <sup>5</sup> / 0.2 x 10 <sup>5</sup>	0.07 x 10 <sup>5</sup> / 0.1 x 10 <sup>5</sup>

MPN- most probable number, BOD<sub>5</sub>- biochemical oxygen demand over 5 days, COD- chemical oxygen demand, SD- standard deviation.

Table 2 Gram-negative bacteria isolated and identified using established biochemical procedures.

Bacteria	Influent (n)	Clarifier tank effluent (n)	Chlorine contact tank effluent (n)	Total
<i>Aeromonas</i> spp.	3	2	0	5
<i>Citrobacter freundii</i>	4	1	0	5
<i>Enterobacter asburiae</i>	0	0	3	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	15	16	1	32
<i>Enterobacter</i> spp.	0	4	2	6
<i>Escherichia coli</i>	24	8	3	35
<i>Escherichia hermannii</i>	1	0	0	1
<i>Klebsiella ornithinolytica</i>	1	0	0	1
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4	3	2	9
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	41	31	18	90
<i>Klebsiella terrigena</i>	0	1	1	2
<i>Pantoea agglomerans</i>	10	10	6	26
<i>Proteus mirabilis</i>	1	0	0	1
<i>Serratia marcescens</i>	1	0	0	1
<i>Serratia rubidaceae</i>	1	0	0	1
Total	106	79	36	221

n- Number of isolates.

Table 3 Antimicrobial resistance among bacteria wastewater isolates

Wastewater samples (n)	Antimicrobials										
	KF (%)	AK (%)	SXT (%)	TZP (%)	MEM (%)	CIP (%)	FOX (%)	IPM (%)	CTX (%)	FEP (%)	CAZ (%)
Influent (106)	75 (71)	28 (26)	36 (34)	16 (15)	3 (3)	18 (17)	29 (27)	1 (1)	47 (44)	9(8)	9(8)
Clarifier tank effluent (79)	66 (83)	18 (23)	29 (37)	14 (18)	1 (1)	21 (26)	33 (42)	0 (0)	39 (49)	8 (10)	14 (18)
Chlorine contact tank effluent (36)	30 (83)	15 (41)	15 (41)	8 (22)	1 (3)	8 (22)	18 (50)	0 (0)	20 (55)	3 (8)	10 (28)
<b>Total (221)</b>	<b>171 (77)</b>	<b>61 (28)</b>	<b>80 (36)</b>	<b>38 (17)</b>	<b>5 (2)</b>	<b>47 (21)</b>	<b>80 (36)</b>	<b>1 (0.4)</b>	<b>106 (48)</b>	<b>20 (9)</b>	<b>33 (15)</b>

n- Number of isolates, AK- amikacin, KF- cefalotin, SXT- trimethoprim-sulphametoxazole, TZP- piperacillin/tazobactam, MEM- meropenem, CIP- ciprofloxacin, FOX- cefoxitin, IPM- imipenem, CTX- cefotaxime, FEP- cefepime, CAZ- ceftazidime.

Table 4 Bacterial isolates characterized as ESBL producers

Bacterial isolates ESBL positive	Influent (n)	Clarifier tank effluent (n)	Chlorine contact tank effluent (n)	Total
<i>Aeromonas</i> spp.	1	0	0	1
<i>E. asburiae</i>	0	0	2	2
<i>E. cloacae</i>	10	12	1	23
<i>Enterobacter</i> spp.	0	0	2	2
<i>E. coli</i>	5	2	0	7
<i>K. oxytoca</i>	4	2	2	8
<i>K. pneumoniae</i>	17	13	8	38
<i>P. agglomerans</i>	4	7	5	16
Total	41	36	20	97

n- Number of isolates.

Table 5 Frequency of beta-lactamases genes detected in isolates

Beta-lactamases genes	Number of isolates (%)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	7 (7)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>TEM</sub>	35 (36)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>TEM</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	22 (23)
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	1 (1)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	8 (8)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub> ; <i>bla</i> <sub>SHV</sub>	15 (16)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	9 (9)
Total	97(100)

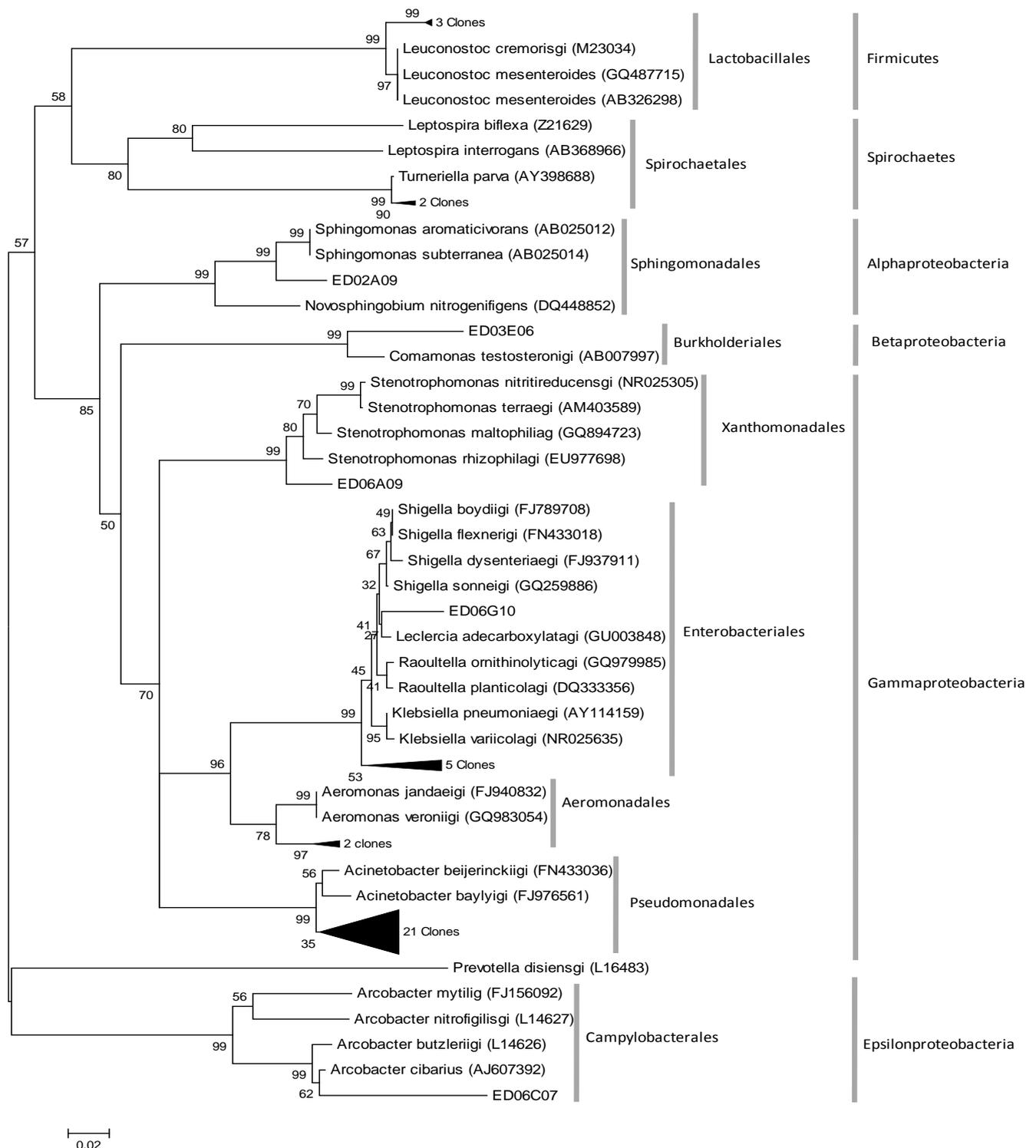


Figure 1 Phylogram of the bacterial 16S rRNA clones obtained from hospital wastewater. The clone sequences and nearest neighbors obtained were used. The phylogram was calculated with MEGA 4.0 using neighbor-joining method and Jukes-Cantor model. Numbers at the branches show bootstrap percentages after 1000 replications of bootstrap sampling.

## ANEXO B - Trabalho publicado em “*The Journal of Hospital Infection*”

### Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater

Madam,

Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-producing isolates of *Klebsiella pneumoniae* are a major problem and concern. The first KPC-producing isolate was *K. pneumoniae* from the USA, identified in 1996, with subsequent identifications in China, Europe, Israel, Central and Brazil.<sup>1</sup> The KPC  $\beta$ -lactamases, a mostly plasmid-encoded enzyme from *K. pneumoniae*, hydrolyse penicillins, cephalosporins, monobactams (aztreonam) and carbapenems, and are weakly inhibited by clavulanic acid and tazobactam.<sup>2</sup> Genetic analysis of *bla*<sub>KPC</sub> genes indicates that their mobility and dissemination are related to a Tn3-based transposon, Tn4401, which is carried by large plasmids varying in size and structure.<sup>3,4</sup> During the last few years, several carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-producing strains have been reported in Brazil in hospitalised patients.<sup>5</sup> This report describes the first detection of KPC-2-producing *K. pneumoniae* strains isolated in wastewater of a hospital sewage treatment plant, Rio de Janeiro, Brazil.

In August and December 2008, two KPC-2-producing isolates were recovered from effluents of a sewage treatment plant that services a hospital located in the metropolitan area of Rio de Janeiro, Brazil. The strains were collected from clarifier tank effluent ( $N=1$ ) and chlorine contact tank effluent ( $N=1$ ). The antimicrobial susceptibility profile was determined by the agar diffusion method according to CLSI guidelines.<sup>6</sup> After species identification and antimicrobial susceptibility testing, isolates were screened for the ESBL and carbapenemase-producing phenotypes by the standard double-disc synergy test and a modified Hodge test. The minimum inhibitory concentrations were determined using Etest strips according to the manufacturer's recommendations. Polymerase chain reaction testing was performed, as previously described, for the presence of the *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes. Amplification products were purified and sequenced in 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, CA, USA), at the PDTIS-IOC DNA Sequencing Platform. Sequences were compared with those in GenBank database.

All *K. pneumoniae* isolates showed resistance to broad-spectrum cephalosporins and carbapenems. We detected the co-resistance of piperacillin/tazobactam, ciprofloxacin and trimethoprim-sulphamethoxazole. The *K. pneumoniae* strains were of two genotypes (A,B).

KPC-2 producing isolates harboured other  $\beta$ -lactam resistance enzymes detected by the presence of the genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> in all strains, whereas *bla*<sub>CTX-M</sub> was carried only by the genotype A. Sequencing of *bla*<sub>KPC</sub> revealed a KPC-2 in all strains studied (Table I).

The occurrence of KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates in hospital is concerning and may have a real impact on public health, principally by dissemination of these micro-organisms and their plasmids into the environment. The rapid dissemination of KPC enzymes worldwide and the consequences for treatment and infection control measures warrant a high degree of awareness and monitoring of these enzymes. The low efficacy or lack of hospital sewage treatment may contribute to the dissemination of KPC-2-producing and others multi-drug-resistant bacteria from the hospital to the environment. Thus, the hospital effluent may be considered as a potential vector of contamination and spread of these emerging resistance determinants and multidrug-resistant micro-organisms. Approaches to reducing environmental microbial contamination should be considered by hospitals. However, the vast majority of hospitals in developing countries do not have sewage treatment plants, which exacerbates the problem and may have important public health implications.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Funding sources

This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Instituto Oswaldo Cruz.

#### References

1. Peirano G, Seki LM, Passos VLV, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009;**63**:265–268.
2. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007;**60**:470–482.
3. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -lactamase *bla*<sub>KPC</sub> Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;**52**:1257-1263.
4. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;**9**:228-236.

5. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;**53**: 333-334.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute 2008. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI/NCCLS M100–S17*. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

T.P.G. Chagas <sup>a</sup>  
 L.M. Seki <sup>a</sup>  
 D.M. da Silva <sup>b</sup>  
 M.D. Asensi <sup>a\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

<sup>b</sup> Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil

\* Corresponding author. Address: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, Brasil.  
 Phone +55-21-2598-4277, ext. 319; fax: +55-21-2270-6565.  
 E-mail address: marise@ioc.fiocruz.br (M.D. Asensi)

Table I  
 KPC-producing *K. pneumoniae* strains isolated from hospital wastewater

Strain	Date	Genotypes	MIC (mg/L)			β-lactamases	Co-resistance <sup>a</sup>
			IPM	MEM	ETP		
Kp 160	August 2008	A	2	4	> 32	KPC-2; CTX-M; SHV; TEM	SXT, TZP, CIP
Kp 232	December 2008	B	3	6	> 32	KPC-2; SHV; TEM	TZP

MIC, minimum inhibitory concentration; IPM, imipenem; MEM, meropenem; ETP, ertapenem; SXT, trimethoprim-sulphamethoxazole; TZP, piperacillin/tazobactam; CIP, ciprofloxacin..

<sup>a</sup> Intermediate was considered resistant in this analysis.